

**Das Vorkommen und der Bakteriologische
Nachweis von Vibrionen beim
weiblichen Rind**

Karl Friedrich Grögel

Aus der Bayerischen Landesanstalt für Tierseuchenbekämpfung
in Schleißheim

Direktor: Professor Dr. H. S c h e l l n e r

Vorgelegt vom Institut für Tierhygiene der tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Vorstand: Professor Dr. A. M e y n

DAS VORKOMMEN UND DER BAKTERIOLOGISCHE NACHWEIS
VON VIBRIONEN BEIM WEIBLICHEN RIND

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung der veterinär-medizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München



von

Karl Friedrich Grögel
aus Nördlingen

1957

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Professor Dr. H. L i e b m a n n

Referent: Professor Dr. A. M e y n

Tag der Promotion: 24. Juli 1957

UNI - Druck, M ü n c h e n 13, Amalienstraße 85

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. EINLEITUNG	1
II. LITERATUR	3
A. Allgemeines	3
B. Spezieller Teil	4
1. Die im Genitale des Rindes vorkommenden verschiedenen Arten von Vibrionen	4
2. Lokalisation und Häufigkeit von Vibrionen im Genitale des weiblichen Rindes	5
a) Lokalisation	5
b) Häufigkeit	6
3. Lokalisation und Häufigkeit in bovinem Verwerfensmaterial	6
a) Lokalisation	6
b) Häufigkeit	7
4. Die Widerstandsfähigkeit von Vibrionen gegenüber äußeren Einflüssen	9
5. Die Gewinnung von Untersuchungsmaterial beim nichtträchtigen weiblichen Tier zum kulturellen Vibrionennachweis	10
6. Kultureller Nachweis von Vibrionen	11
7. Nährböden zur Vibrionenzüchtung	12
a) flüssig	12
b) halbfest	12
c) fest	13
8. Differenzierung der im Genitale des Rindes vorkommenden Vibrionen	15

III. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	17
A. Versuchsbedingungen	17
1. Untersuchungsmaterial	17
2. Probeentnahme	17
a) Vom Schlachthof stammendes Material	17
b) Material von Geburten und Verwerfensfällen	18
3. Die Anzüchtung des Untersuchungsmaterials	19
a) Schlachthofmaterial	19
b) An die Anstalt eingesandtes Material	20
4. Auswertung der halbfesten Nährböden	21
5. Die Vibrionenzüchtung auf festen Nährböden	21
6. Differenzierung der Vibrionenstämme	23
B. Versuchsergebnisse	24
1. Vom Schlachthof stammendes Material	24
2. An die Anstalt zur Feststellung von spezifischen Verwerfenserregern eingesandtes Material	29
a) Normale Nachgeburten	29
b) Nachgeburten von Verwerfensfällen	29
c) Verwerfene Früchte	30
d) Nachgeburten mit zugehörigen Feten	31
e) Spät- und Frühverwerfensfälle	31
f) Mumifizierte Früchte	32
g) Zeit zwischen Anfall und Anzüchtung des Materials	32
h) Reinkultur	32
C. Besprechung der Versuchsergebnisse	34
IV. ZUSAMMENFASSUNG	37
V. LITERATUR	39
Lebenslauf	

I. E I N L E I T U N G

Die Diagnose der Vibriosis des Rindes wird entweder durch den direkten bakteriologischen Nachweis des Erregers in verworfenen Früchten oder sonstigen Ausscheidungsproben männlicher und weiblicher Rinder oder indirekt durch den Nachweis von Antikörpern im Cervicalsehim und Blut der infizierten Tiere gestellt.

Nach dem heutigen Stand unserer Kenntnisse darf als sicher angenommen werden, daß die im Genitale des Rindes vorkommenden Vibrionen nicht einheitlicher Natur sind, daß 2 Arten gefunden werden und zwar die als pathogen und als Erreger der Vibriosis angesprochenen katalaseaktiven und die als apathogen geltenden katalasenegativen Stämme. Eine Differenzierung auf Grund der morphologischen Eigenschaften ist nicht möglich, so daß bei Nachweis von Vibrionen in den Geschlechtsorganen die Reinzüchtung und biochemische Differenzierung notwendig ist. Voraussetzung für das möglichst sichere Gelingen der Reinkultur sind saubere und von Begleitkeimen freie Untersuchungsproben.

Zum Nachweis von Vibrionen beim weiblichen Tier sind verschiedene Methoden zur Entnahme von Cervicalsehimproben, in denen Vibrionen am häufigsten festzustellen sind, angegeben. In Betracht kommen hierzu das Brod-auf'sche Sauggerät, Glaspipetten, das Einlegen von Gazetupfern und die Vaginalspülung nach Steger (59). In den Untersuchungen von Götz (20) zeigte sich, daß das Verfahren nach Steger weniger geeignet ist, so daß praktisch nur den übrigen Methoden eine Bedeutung zukommt.

Bei stichprobenweiser Untersuchung von Material von bovinen Verwerfensfällen an der B.Landesanstalt für Tierseuchenbekämpfung hat sich ergeben, daß durch ein Anreicherungsverfahren in mikroskopisch negativen Fällen öfters katalasepositive Vibrionen festgestellt werden können (Weickl (76)). Mir wurde von Herrn Professor Dr. H. Schellner die Aufgabe gestellt, die Eignung zweier Entnahmemethoden von Cervicalsehim zum kulturellen Nachweis von Vibrionen zu prüfen. Des weiteren sollten alle zur Untersuchung auf Verwerfenserreger eingesandten Proben, gleichgültig, ob in denselben bereits andere spezifische Verwerfenserreger nachgewiesen werden

konnten oder nicht, auf das Vorkommen von Vibrionen geprüft und die Reinkultur und biochemische Differenzierung der Stämme versucht werden.

- - - - -

II. L I T E R A T U R

A. Allgemeines

Bei seinem Versuch, die Mikroorganismen systematisch einzuteilen, bezeichnete Müller (44) 1773 die im Wasser beweglichen Mikroben als Vibriones. Gegenwärtig wird die Bezeichnung *Vibrio* als Gattungsname gebraucht (Rolle (53)). Bergey (6) betrachtet die Gattung *Vibrio* als zur Familie der Pseudomonaceae gehörig; er definiert sie als kurze, gebogene Stäbchen, einzeln oder zu Spiralen vereinigt vorkommend, die allgemein mittels einer polaren Geißel beweglich sind. Im frischen Infektionsmaterial sowie in jungen Kulturen besitzt *Vibrio fetus* nach Bergey Komma- oder Bumerangform.

1908 fanden Mc Fadyean u. Stockman (39) in abortierten Schaffeten Keime von Spirillenform, die sie als Verwerfensursache betrachteten. 1913 gelang ihnen die Reinzüchtung. Smith (56) sah 1918 in verworfenen Rinderfeten morphologisch gleiche Keime und belegte sie mit dem Namen *Vibrio fetus*. Jones, Orcutt u. Little (30) wiesen 1931 *Vibrio*-nen im Rinderdarm nach und nannten sie *Vibrio jejuni*. Doyle (14) und Messerli (41) wie auch Schmid u. Klinger (55) bezeichnen die im Darm von Schweinen vorkommenden Vibrionen als *Vibrio coli*. Harms u. Hörter (22) gaben ihnen den Namen *Vibrio suis*. Ebenso berichtet Roberts (52) 1956 aus Australien über das Auftreten einer durch Vibrionen verursachten Schweinedysenterie.

B. Spezieller Teil

1. Die im Genitale des Rindes vorkommenden verschiedenen Arten von Vibrionen.

Bergey (6) zufolge sind alle im Geschlechtsapparat des Rindes vorkommenden Vibrionen als *Vibrio fetus* anzusprechen. Ebenso sind die aus verworfenen Früchten erhaltenen Vibrionen als *Vibrio fetus* zu bezeichnen.

Die Forschungen von Vandeplasse u. Mitarbeitern (72) sowie von Easterbrooks u. Mitarbeitern (15) haben gezeigt, daß es sich auf Grund des verschiedenen kulturellen und biochemischen Verhaltens um verschiedene Arten von Vibrionen handelt. Sie unterscheiden sich in der Katalaseaktivität und Schwefelwasserstoffbildung. Die Benennung *Vibrio fetus* gebrauchen diese Autoren nur für die als pathogen erkannten Vibrionen. Diese sind nach ihrer Auffassung die Ursache sowohl der enzootischen Sterilität als auch des Vibrionenaborts, sie sind stets infektiösfähig. *Vibrio bubulus* und *Vibrio percolans* sehen sie als saprophytäre Keime an.

Vandeplasse (70) erwähnt außer *Vibrio fetus* und *Vibrio bubulus* noch Vibrionen, die er als Typ III bezeichnet. In Übereinstimmung mit ihm teilen Akkermans, Terpstra u. van Waveren (3) die bei Rindern gefundenen Vibrionen auf Grund ihrer Pathogenität und ihrer kulturellen, biochemischen und morphologischen Eigenschaften in drei Gruppen ein:

Gruppe 1: Pathogene Vibrionen, die aus dem Präputium von Bullen und dem Genitaltrakt von weiblichen Rindern isoliert wurden und Sterilität verursachen. Sie waren katalasepositiv und H_2S -negativ und zeigten in Stichkulturen kein Tiefenwachstum. Ihre Gestalt war spiralenförmig. Sie wuchsen nur in Gegenwart von 10% CO_2 bei einer Verminderung des Sauerstoffdruckes um 40 cm.

Gruppe 2: Apathogene Vibrionen, isoliert aus dem Geschlechtsapparat von anscheinend normalen Bullen und selten von Kühen, deren Vorkommen nicht von dem Auftreten von Sterilität begleitet ist.

Sie waren katalasenegativ und H_2S -positiv und wiesen in Stichkulturen Tiefenwachstum auf. Ihr Aussehen war kommaförmig. Zum Wachstum waren die gleichen Bedingungen wie bei Gruppe 1 erforderlich.

Gruppe 3: Diese Vibrionen wurden nur aus verworfenen Früchten gezüchtet und nie in Fällen von Sterilität oder bei Bullen gefunden. Ihre Form war spiralig. Sie unterschieden sich von den beiden vorigen Gruppen dadurch, daß sie in einer 10%igen CO_2 -Atmosphäre bei normalem und vermindertem Sauerstoffdruck gut wuchsen. Sie waren katalasepositiv und H_2S -negativ.

2. Die Lokalisation und Häufigkeit von Vibrionen im Genitale des weiblichen Rindes.

a) Lokalisation

Adler (1) berichtet, daß sich Vibrionen im Uterus des Rindes nur bis zur kaudalen Hälfte finden. Marbach (38) wies bei einem Rind *Vibrio fetus* im Vaginalschleim, bei zwei weiteren im Cervicalsehim nach, als er 19 Tiere, die verworfen hatten, untersuchte. Vandeplasche u. Mitarbeiter (72) erkannten, daß *Vibrio fetus* am 10. Tag nach dem Deckakt regelmäßig im ganzen Uterus nachweisbar ist. Auch Mundt (46) züchtete aus dem Scheidenvorhof, Diverticulum suburethrale, der Cervix, dem rechten Uterushorn und dem dazugehörigen Eileiter einer seit 1 1/2 Jahren umrindernden Kuh *Vibrio fetus*. Nach Berthelon u. Tournut (7) ist *Vibrio fetus* im gesamten Genitaltrakt lokalisiert. Terpstra u. Eisma (63) isolierten aus Scheidenschleim, Cervix, Uterus und Eileiter von 6 Versuchsrindern *Vibrio fetus*. Insgesamt hatten sie 12 Rinder von 2 infizierten Bullen decken lassen. Nur im Vaginalschleim konnten Easterbrooks u. Mitarbeiter (15) sowie Florent (17) *Vibrio bubulus* und *Vibrio percolans* finden. Wohanka u. Hubrig (82) züchteten regelmäßig am 3. Tage nach natürlicher Bedeckung oder künstlicher Besamung bei Versuchsfärsen aus dem Cervicalsehim katalasepositive Vibrionen, wenn die Tiere von einem infizierten Bullen gedeckt oder mit dem Spülprobenzentrifugat oder Samen infizierter Bullen besamt worden waren.

b) Häufigkeit.

Götz (20) konnte in 28 von 314 untersuchten Kühen Vibrionen im Vaginalschleim nachweisen, desgleichen in 1 Fall bei 81 untersuchten Kalbinnen. Hubrig (24) gelang bei der Untersuchung von 100 willkürlich entnommenen Cervicalschleimproben nur einmal der Nachweis von Vibrionen. Dedié u. Voigt (12) entdeckten in 69 von 354 (19%) untersuchten Sekret- und Schleimproben Vibrionen. Hubrig u. Röhr (25) berichten über die Isolierung von 45 katalasepositiven und 2 katalasenegativen Vibrionenstämmen aus Vaginal- und Cervicalschleimproben von 183 Färsen sowie von 1 katalasenegativen und 8 katalasepositiven Stämmen aus Cervical- und Vaginalschleim von 89 Kühen.

Hignett (23) konnte bei der Untersuchung von 180 Herden mit mangelnder Fruchtbarkeit in 48 Fällen Vibrionen ermitteln. Lawson u. McKinnon (33) war es möglich, bei 42 von 90 virginellen Kalbinnen, die versuchsweise von einem mit *Vibrio fetus* infizierten Bullen gedeckt waren, 10 Tage nach dem Deckakt im Scheidensekret *Vibrio fetus* kulturell nachzuweisen. Adler (1) isolierte aus dem Uterus von 95% der angesteckten Rinder *Vibrio fetus*, während Wohanka u. Hubrig (82) aus dem Scheidenschleim einer Kalbin Vibrionen züchteten, die nach der biochemischen Prüfung nicht als *Vibrio fetus* anzusprechen waren.

3. Lokalisation und Häufigkeit in bovinem Verwerfensmaterial

a) Lokalisation

Gauthier u. Cheve (19) betonen die Wichtigkeit der Untersuchung der Placenta. Da die uterine Infektion zuerst an den Fruchthüllen haftet, scheint es ihnen vom praktischen Standpunkt aus hinreichend, Kulturen aus Teilen der Chorionzotten anzulegen; auch Deas (11) äußert sich in gleichem Sinne.

Ehrlich (16) bezeichnet als geeignetes Untersuchungsmaterial Fetus, Fruchtwasser und Secundinae. Er empfiehlt in Übereinstimmung mit Easterbrooks u. Mitarbeitern (15) die Isolierung von Vibrionen aus dem Mageninhalt des Fetus. Nagel (47) vertritt dieselbe Auffassung, ebenso bestätigt Beer (5) das Vorkommen von Vibrionen im Magen-

Inhalt. Vincent u. Alloy (73) fanden im Herzblut und Gehirn von abortierten Schaffeten *Vibrio fetus*. Bei in Fäulnis übergangenen Feten empfehlen sie Proben aus dem Gehirn zu untersuchen. Auch Lawson u. McKinnon (34) raten, bei stark verunreinigtem Fetus oder wenn, wie es manchmal der Fall ist, der tote Körper von Katzen oder Hunden ausgehöhlt wurde, Gehirnmaterial zum Nachweis von Vibrionen zu verwenden.

Nach Stepkowski (60) sind Vibrionen in den Cotyledonen, im Fruchtwasser, in Leber, Milz, Lunge, Nieren und vor allem im Magen nachzuweisen, wobei die Anwesenheit von Mekonium im Magen als Charakteristikum für das Vorliegen eines Vibrionenabortes zu betrachten sei. Nach Stegenga (58) liefert der Vibrionennachweis aus Dickdarm und Leber die besten Ergebnisse, während Prier (50) u.a. auch das Blut der abortierten Feten als zum Vibrionennachweis geeignet angibt und Trilenko (67) die Untersuchung der Placenta als ausreichend erachtet.

b) Häufigkeit

Die Kulturversuche, die Gauthier u. Cheve (19) in 41 Verwerfensfällen unternahmen, waren 32 mal positiv. Das von ihnen bearbeitete Untersuchungsmaterial bestand 28 mal aus Fetus und Placenta, 11 mal nur aus dem Fetus und 2 mal allein aus der Placenta. 1952 wiesen Baier u. Taxacher (4) in den Eihäuten von 2 Kühen erstmals in Süddeutschland *Vibrio fetus* nach. Aus Japan berichten Kawashima, Iwata u. Suzuki (31), daß sie von 1936 bis 1953 bei 143 von 561 untersuchten Feten *Vibrio fetus* fanden. Beer (5) stellte als Verkalbeursache *Vibrio fetus* in 10,51% von 152 Abortfällen fest. Hubrig u. Röhr (25) züchteten aus 85 Feten und Eihäuten 66 katalasepositive Vibrionenstämme. Wohanka (81) konnte 27 mal Vibrionen aus 61 untersuchten Feten bzw. Placenten isolieren. Lawson u. McKinnon (33) prüften von 1947 bis 1951 in Weybridge 1302 abortierte Feten. Bei 8,6% kamen Vibrionen zur Feststellung.

Bei Rindern, die mit *Brucella abortus* Stamm 19 vakziniert worden waren, wies Wilson (79) in 7 von 32 abortierten Feten *Vibrio fetus* nach. Pröger (51) erhielt bei 6 von 11 abortierten Feten Vibrionen. Sie stammen aus 5 Gemeinden mit Fruchtbarkeitsstörungen.

Witte (80) wies bei 27 Verwerfensfällen (Feten) 11 mal Brucellen, 5 mal

Spirillen, 1 mal Pseudo-Tbc. und 1 mal Salmonellen nach. Thomsen (65) untersuchte Nachgeburtssteile, die von sporadischen Aborten stammten und fand 21 mal (6%) mikroskopisch und 1 mal kulturell Spirillen. 2 mal diagnostizierte er eine Mischinfektion von Brucellen und Spirillen. Dedié u. Voigt (12) stellten 1 mal das gleichzeitige Vorkommen von Brucellen und Vibronen fest. Smith u. Mitarbeiter (57) ermittelten bei 109 untersuchten Verwerfensfällen 62 mal Brucellen, 26 mal (23,8%) Spirillen und 2 mal Pyogenesbakterien. 1 mal lag eine Mischinfektion von Brucellen und Spirillen vor. Nach van Ulsen (68) verteilen sich die Verkalbeursachen in Holland wie folgt: 138 mal Brucellen, 15 mal Streptokokken, 12 mal *B. pyocyaneum*, 9 mal *Vibrio fetus*, 8 mal Trichomonaden, 2 mal *E. coli*, 1 mal Staphylokokken, 1 mal Listerien. Aus dem von Olson (49) 1946 herausgegebenen Bericht über die von 1924 bis 1943 durchgeführten Untersuchungen geht hervor, daß 10% der Nachgeburten von Verwerfensfällen mit *Vibrio fetus* infiziert waren.

Aufschlußreiche Daten bringt Weikl (76) in seiner Veröffentlichung über die Feststellung von Vibrionen im Einzugsgebiet der B. Landesanstalt für Tierseuchenbekämpfung. Etwa 2100 Feten und Sekundinen wurden zunächst nur mikroskopisch auf Vibrionen untersucht. Bei 103 Fällen waren Vibrionen nachweisbar. Durch Einschaltung eines Anreicherungsverfahrens wurden bei 45 bakterioskopisch negativen Verwerfensfällen in 12 Proben Vibrionen ermittelt. Bei 7 dieser 12 Stämme gelang die Reinkultur und Differenzierung. Sie waren katalasepositiv und bildeten kein H_2S . Da es sich mit einer Ausnahme bei allen bisher aus Feten gezüchteten Stämmen um *Vibrio fetus* handelte, kommt Weikl zu der Auffassung, daß es sich auch bei den bisher nur mikroskopisch in Nachgeburten und Feten festgestellten Vibrionen um pathogene Arten gehandelt hat. Auf Grund seiner Untersuchungsergebnisse folgert er, daß prozentual wesentlich mehr Verwerfensfälle in die ersten 4 Trächtigkeitsmonate fallen als in die zweite Hälfte der Trächtigkeit. Die Prozentzahlen von Vibrionenfunden gibt der Autor für die ersten 4 Trächtigkeitsmonate mit 15,4 und für die zweite Trächtigkeitshälfte mit 3,6 an.

Die Widerstandsfähigkeit von Vibrionen gegenüber äußeren Einflüssen

Über die Tenazität der Vibrionen liegen nur unvollständige Angaben in der Literatur vor. Wenn sich auch viele Autoren dahingehend aussprechen, daß Vibrionen gegenüber äußeren Einflüssen sehr empfindlich sind, so berichtet Vandeplassche (70), daß die Vibrionen im uneröffneten Uterus 3 Tage lebend bleiben. Bei Untersuchungen an weiblichen Schlachtrindern kam Götz (20) zu dem Ergebnis, daß eine Anzüchtung des Untersuchungsmaterials baldmöglichst nach der Entnahme notwendig ist. Ein Zeitraum von 24 Stunden zwischen Entnahme und Anzüchtung ließ seine kulturellen Ergebnisse bereits um 50% absinken. Lindenstruth u. Ward (36) füllten in je 3 Flaschen Heu, Erde und Dünger und beschickten sie mit je 1 ccm Kulturaufschwemmung, die sie von 3 Tage alten *Vibrio fetus*-Blutagar-Kulturen mit physiologischer Kochsalzlösung erhalten hatten. Sie hielten die Flaschen bei 37, 20 und 6°C und prüften alle 10 Tage auf Lebensfähigkeit der Vibrionen. Nach 10 Tagen waren die Vibrionen in sämtlichen Flaschen noch am Leben, nach 20 Tagen nur noch in den bei 6°C gehaltenen Flaschen, nach 30 Tagen auch darin nicht mehr.

Bei Untersuchungen über die Tenazität von *Vibrio fetus* außerhalb des Tierkörpers fand Zintz (83), daß *Vibrio fetus* in Rinder- und Schweinejauche seine Lebensvorgänge sofort einstellte. Er zieht daraus den Schluß, daß *Vibrio fetus* nicht durch Jauche weiterverbreitet zu werden scheint.

Vandeplassche u. Mitarbeiter (72) berichten, daß *Vibrio fetus* im pathologischen Material nach Aufbewahrung von 24 Stunden unbeweglich, *Vibrio bubulus* dagegen sehr beweglich ist. Hatten sie die Möglichkeit, eine abortierte Frucht in frischem Zustand zu untersuchen, so konnten sie nach Wegspülen der meist reichlich vorhandenen, sehr beweglichen saprophytären Vibrionen (*Vibrio bubulus*) und anderen Bakterien in der Tiefe des Placentagewebes oder in den inneren Organen der Frucht die sehr wenig beweglichen oder unbeweglichen Vibrionen (*Vibrio fetus*) im Phasenkontrastmikroskop erkennen. Die Kultur gelang ihnen dabei in 80% der Fälle. Nach Voigt (74) überleben Vibrionen eine Antrocknung an Tupfern nicht und Dedié u. Voigt (12) fordern die Verarbeitung

von Untersuchungsmaterial innerhalb von 24 Stunden, sie empfehlen eine Abkühlung des Untersuchungsmaterials zu vermeiden. Leidl u. Mahr-la (35) stellten fest, daß *Vibrio fetus* bei der Samentiefkühlung Temperaturen von -79°C überlebt.

Nach Zusatz von *E. coli* zu *Vibrio fetus*-Keimen beobachtete Zintz (83), daß bereits nach 24-stündiger Bebrütung die *Vibrio fetus*-Zellen zerfallen waren. Bei Beimpfung von *Vibrio fetus*-haltigen Nährböden mit *Bact. pyocyaneum* war nach 24 Stunden keine *Vibrio fetus*-Zelle mehr festzustellen. Schließlich erkannten Rolle u. Mundt (54), daß *Bac. mesentericus* das Wachstum der Vibrionen unterdrückt.

5. Die Gewinnung von Untersuchungsmaterial beim nicht-trächtigen weiblichen Tier zum kulturellen Vibrionennachweis

Da der kulturelle Vibrionennachweis in verunreinigtem Material wohl möglich ist, die Reinkultur durch das Wachstum unspezifischer Keime aber sehr erschwert bzw. bei Anwesenheit von *Bact. proteus* oder *Pseudomonas aeruginosa* unmöglich werden kann, wurden verschiedene Verfahren und Geräte zu einer möglichst keimarmen Probeentnahme beim weiblichen Rind in Anwendung gebracht. So vermutet Voigt (74) lebensfähige Vibrionen in der Tiefe der Genitalschleimhäute. Um frisches Sekret aus der Tiefe nicht nur während der Brunst zu erhalten, provoziert er die Schleimabsonderung beim weiblichen Rind durch Einzwängen eines Tupfers in die hervorgezogene Cervix, der sich dabei mit frischem, natürlich abgesondertem Sekret vollsaugt. Aus der gleichen Überlegung heraus entwickelte Brodauf (8) ein Gerät zur Entnahme von Portiosekret: In einem Saugkopf, der mit einem starren Katheter verbunden ist, befindet sich ein steriler Gazetupfer, der das angesaugte Sekret auffängt.

Auf der Tagung über die Unfruchtbarkeit des Rindes in Kopenhagen (62) wurde als Standardmethode die Probenentnahme mittels der von den Holländern entwickelten Vaginalpipette empfohlen. Es handelt sich um eine 50 cm lange und ca. 1 cm weite Glaspipette, die in 10 cm Entfernung von einem Ende im Winkel von ca. 30° abgebogen ist.

Hughes (28) gewinnt Schleim, indem er durch ein Röhrenspekulum einen mit einer Schnur befestigten Gazetupfer mittels eines Stabes in den

vorderen Teil der Vagina einführt. Nach Entfernung des Spekulum bleibt der Tupfer 20 Minuten in situ. Hat er sich mit Schleim vollgesaugt, so wird er durch Ziehen an der Schnur entfernt und weiterverarbeitet. Die von Merkt u. Sanchez-Garnica (40) beschriebene Methode ist der vorigen fast gleich.

Zur Entnahme von Scheidenschleim bei Kalbinnen bedient sich Vandeplassche (71) einer Plastikpipette mit Gummiballon. Florent (17) gebraucht hierzu einen langen gestielten Löffel. 1954 beschrieb Steger (59) eine Methode zur Entnahme von Scheidenschleim; er schwemmt die Scheide mittels physiologischer Kochsalzlösung aus (Scheidenschwemme). Zur Gewinnung von Untersuchungsmaterial aus dem Uterus entwickelte Adler (2) einen Biopsie-Apparat.

Da die Untersuchung auf Vibrionen von der Frische des abgesonderten und gesammelten Schleimes abhängig ist, wird von der Kopenhagener Tagung (62) die Verwendung von Brunstschleim zum kulturellen Nachweis empfohlen. Auch Ehrlich (16) hält Brunstschleim für besonders geeignet. Lawson u. McKinnon (33) hatten bei der Untersuchung von Brunstschleim auf Vibrionen bei Rindern 60 kulturell positive Ergebnisse, Florent (17) bei gleichem Untersuchungsmaterial 40 %.

6. Kultureller Nachweis von Vibrionen

Zur Sicherung einer *Vibrio fetus*-Diagnose fordert Vandeplassche (70) den direkten kulturellen Nachweis der Vibrionen. Als Untersuchungsmaterial kommen beim weiblichen Rind Genitalsekretproben in Frage. Diese können verhältnismäßig leicht und keimarm mittels der im vorigen Abschnitt beschriebenen Methoden gewonnen werden.

Zur Untersuchung von Material aus Verwerfensfällen sind bei Vorliegen der Placenta Abstriche von den Cotyledonen geeignet. Liegt der Fetus vor, so können Proben aus Mageninhalt, Leber, Lungen, Nieren, Blut, Bauchhöhlenflüssigkeit und Fruchtwasser sowie Gehirn Verwendung finden. Da diese Proben jedoch stets stark mit pathogenen oder saprophytären Begleitkeimen durchsetzt sind, ist die Aussicht auf Reinzüchtung entsprechend gering.

Nach Jansen u. Kunst (29) zieht *Vibrio fetus* einen Nährboden mit

animalischem Eiweiß vor und verlangt eine niedere Sauerstoffspannung. Florent (17) bezeichnet *Vibrio fetus* als mäßig, *Vibrio bubulus* als stark anaerob. Die Anwesenheit von organischen Schwefelverbindungen ist nach Rolle u. Mundt (54) für das Wachstum der Vibrionen von Wichtigkeit und Hubrig (24) mißt dem pH-Wert des Nährbodens eine geringe Bedeutung bei.

7. Nährböden zur Vibrionenzüchtung

a) flüssig:

Harms u. Hörter (22) empfehlen besonders flüssige Nährböden z.B. sterile Magermilch und Leberbouillon, sie weisen auf die monatelange Haltbarkeit der Vibrionen in diesen Medien hin. Rolle u. Mundt (54) züchteten *Vibrio fetus* in Thioglykolatbouillon. Das Wachstum in Leberbouillon bezeichnen sie als unbefriedigend. Hansen, Price u. Clements (21) modifizierten mit Erfolg die Thioglykolatbouillon nach Brewer. Morgan (43) äußerte sich über die Eignung derselben zur Aufbewahrung von Vibrionenreinkulturen sehr befriedigt. Voigt (75) verwendet für den kulturellen Nachweis von Vibrionen Leber-Leberbouillon. Nach seinen Erfahrungen eignen sich flüssige Nährböden für die Züchtung von Vibrionen überhaupt am besten, an ihrer Spitze die Leber-Leberbouillon. Die Auswertung der Kulturen geschieht nach 2-3tägiger Bebrütung bei 37°C durch Prüfung von Material im Phasenkontrastmikroskop.

b) halbfest:

Hubrig (24) machte bei seinen Untersuchungen die Erfahrung, daß sich Vibrionen in halbfesten Nährmedien wesentlich schneller entwickeln und setzte daher der Leber-Leberbouillon 0,1% Agar zu. Bereits nach 24-48 Stunden Bebrütung bildeten darin die Vibrionen eine etwa 1 cm dicke, dicht unter der Oberfläche beginnende, grauwolkig, getrübbte Wachstumszone. Wilson (79) glückte die Kultur in einem halbfesten Agar (0,3%) der 5% Blut enthielt unter geeigneten atmosphärischen Bedingungen bei 3-6tägiger Bebrütung und 37°C. Glutathion-Rinderherzbouillon mit 0,1% Agarzusatz sowie Natrium-Thioglykolat mit 0,1% Agarzusatz erscheinen Rolle u. Mundt (54) zur Vibrionen-Kultur geeignet. Gauthier u. Cheve (19) benutzen zur Kultivierung von Vibrionen 2 Nährböden, deren gemeinsame Basis die Rinderherzbouillon darstellt. Mit einem Zusatz

von 0,1% Agar werden die Medien nach den Anweisungen von Brown hergestellt, der pH-Wert auf 7,3 eingestellt und bei 115°C 30 Minuten sterilisiert. Die Auswertung nehmen sie frühestens nach 48 und spätestens nach 72 Stunden vor. Die Isolierung von *Vibrio fetus* gelang ihnen, wenn die Vibrionen etwa 60-70% der Keime darstellten.

Stepkowski u. Winiarski (61) sowie Nowak (48) bezeichnen die mit dem Bartlett'schen Eiernährboden erzielten Erfolge als gut. Jansen u. Kunst (29) beimpften die Allantois von 9 Tage bebrüteten Hühner-Eiern mit Vibrionen und erzielten in diesem Milieu ein gutes Wachstum. Das von den Difco-Werken hergestellte Thiolmedium, angereichert mit 1% Bacto-Supplement B, ist nach Huddleson (zit. nach Difco-Information (13)) zur Isolierung, Kultivierung und für Stammkulturen von *Vibrio fetus* geeignet. Die Kulturen bleiben ohne Überimpfung 150 Tage am Leben.

Die Gewinnung von Vibrionenreinkulturen aus flüssigen oder halbfesten Nährböden ist nicht möglich, da sie fast stets mit Verunreinigungskeimen stark durchsetzt sind und diese ein mindest ebenso gutes Wachstum zeigen. Sie können daher nur als Anreicherungsverfahren Anwendung finden. Bezüglich der atmosphärischen Bedingungen sind dabei keine besonderen Vorkehrungen zu treffen.

c) fest:

Zur Isolierung und Reinzüchtung von Vibrionen aus Untersuchungsmaterial oder flüssigen oder halbfesten Nährböden ist die Verwendung von festen Nährböden unumgänglich. Die Schaffung mikroaerophiler Bedingungen ist für das Wachstum der Vibrionen auf festen Nährböden Voraussetzung, während Menge und Art des Blutzusatzes bei den verschiedenen Untersuchern wechselte.

Hubrig, Wohanka u. Gränz (27) erhalten bei Verwendung von 21/2%igem Nähragar mit einem Zusatz von ca. 17% defibriniertem Pferdeblut "relativ saubere *Vibrio fetus*-Kulturen mit dichter Keimaussaat", falls nicht *Bact. proteus* oder *Pseudomonas aeruginosa* überwuchern. Sie beimpfen den Agar, indem sie den mit Untersuchungsmaterial getränkten Tupfer auf je 3 Platten so austreichen, daß der Schleim möglichst gut auf dem Nährboden haftet. Die Bebrütung der Platten erfolgt für 3 Tage bei Unterdruck in einer 20%igen CO₂-Atmosphäre.

Vibrio fetus erscheint bei der Durchmusterung der Platten im Auflichtmikroskop metallisch-glänzend, bläulich-weiß, während apathogene Vibrionen ein

grünlich-gelbes Aussehen besitzen, doch kann sich bei Verwendung von anderem Blut das Aussehen der Vibrionenkolonien ändern. Es gelingt den Autoren bereits bei der Erstisolation mit hoher Wahrscheinlichkeit die Unterscheidung von pathogenen (katalasepositiven) und apathogenen (katalasenegativen) Vibrionen.

Voigt (75) verwendet Traubenzucker-Blutagar, Kochblut-Agar, Serum-Agar, Einfachblut-Agar, Einfach-Agar und Schafblut-Agar, wobei er das schwächste Vibrionenwachstum auf den beiden letzten Nährböden erzielen konnte. Dedie u. Voigt (12) benutzen außer der Fortner-Platte noch Blut-, Röstblut- und Serumagarplatten. Stepkowski (60) züchtet Vibrionen in einer 15-20%igen CO_2 -Atmosphäre auf Agar, dem 5-10% defibriertes Blut zugesetzt ist. Olson (49) kultivierte die Vibrionen auf 5%igem Pferdeblutagar. Nach Koslak (32) eignet sich für die Isolierung der Vibrionen Agar mit 10% Rinderserum oder 10% frischem Hammelblut. Die Platten werden unter 10%iger CO_2 -Spannung 3 Tage bebrütet.

Terpstra u. Eisma (63) bebrüten Blutagarplatten mit 10% defibriniertem Rinderblut und 1 1/2 % Agar nach der Beimpfung 4-5 Tage bei 37°C in einer 10%igen CO_2 -Atmosphäre bei leichtem Unterdruck. Die Vibrionen erscheinen nach ihren Beobachtungen gewöhnlich als runde, leicht konvexe und reflexive Kolonien mit einem Durchmesser von einigen Millimetern auf der Platte. Diese Vibrionenkolonien besitzen einen unspezifischen Charakter und entwickeln sich im Vergleich zu anderen Keimen der männlichen und weiblichen Geschlechtsorgane langsam. Neben 3%igem Agar-Nährboden verwendet Stegenga (58) auch 3%igen Agar, dem einige Tropfen defibriertes Pferdeblut zugesetzt sind. Die Bebrütung erfolgt 4-5 Tage im Zeißler-topf oder im CO_2 -Schränk. Harms u. Hörter (22) beobachteten nach 7-tägiger Bebrütung auf der 10%igen Rinderblutplatte feinste, schwer erkennbare Vibrionenkolonien in geringer Anzahl. Die Bemühungen von Morgan (43) zur Primärkultur von Vibrionen verliefen mit folgendem Medium erfolgreich:

Aq. dest.	1000,0	
Agar	25,0	
Evanspeptone	10,0	
Lemco	10,0	
NaCl	5,0	
Natriumthioglykolat	1,0	pH 7,6.

Nach 15 Minuten Sterilisation bei 121°C und Abkühlung auf 56°C werden 10% Ochsen- oder Schafblut zugefügt. Die Platten werden bei 37°C und 10% CO_2 6 Tage bebrütet, eine Zeit die notwendig ist, da Platten oft nach 3 Tagen kein, nach 6 Tagen jedoch gutes Vibrionenwachstum zeigen.

Beer (5) beschreibt das Wachstum von *Vibrio fetus* auf Serum-Agar oder Blut-Agarplatten bei Benutzung von *Bact. prodigiosum* als Sauerstoffverzehrer, als eben noch mit bloßem Auge erkennbaren feinen, zarten Belag. Die Kolonien sind hart, ähnlich Rotlaufkolonien.

Frank (18) gebraucht zur Vibrionenkultur 1,5%igen Nähragar mit Zusatz von 10% Kuhblut. Er bebrütet die Kulturen 3-5 Tage bei 37°C unter einem Druck von 42 mm Quecksilber und Zusatz von 10% CO_2 . Nach seinen Angaben wird durch Hinzufügung von 0,3% Thiol zum geschmolzenen Agar ein verstärkter Anreiz für das Wachstum der Vibrionen gegeben. Rolle u. Mundt (54) bezeichnen das Wachstum der Vibrionen auf einem Nährboden, der aus Thiol-Medium mit 2% Agar besteht, als gut. Die Vibrionen bilden kleine, erhabene Kolonien mit der Tendenz zu hellgelb-weißlicher Pigmentierung. Florent (17) empfiehlt Thiol-Medium mit 2% Agarzusatz ebenfalls zur Kultivierung von Vibrionen.

8. Differenzierung der im Genitale des Rindes vorkommenden Vibrionen

Die Differenzierung der isolierten Vibrionen erfolgt nunmehr auf der Grundlage der von Bryner u. Frank (10) erarbeiteten Ergebnisse. Bei der Untersuchung von 164 Vibrionenstämmen aus abortierten Feten, Scheidenschleim von Kühen sowie Samen und Präputialspülungen von Bullen auf kulturelle und biochemische Eigenschaften konnten die genannten Autoren zwei verschiedene Arten unterscheiden:

- a) einen katalasepositiven Typ, den sie als pathogen und damit als den echten *Vibrio fetus* betrachten,
- b) einen katalasenegativen Typ, der die apathogenen Vibrionen umfaßt.

Außerdem konnten sie feststellen, daß die katalasepositiven Vibrionen keinen Schwefelwasserstoff bildeten, während die katalasenegativen Vibrionen Schwefelwasserstoff in reichlichem Maße produzierten. Auf Grund dieser verschiedenen Eigenschaften erfolgt heute allgemein die Unterscheidung der pathogenen von den apathogenen Vibrionen. Nach

Vandeplassche (70) zeigt *Vibrio fetus* in Kulturen kurze und lange Formen, während katalasenegative Vibrionen nur Kurzformen aufweisen. Ersterer wächst nur dicht unter der Oberfläche des Nährbodens, während letztere Tiefenwachstum aufweisen.

Lindquist (37) berichtet über aus dem Genitaltrakt von Rindern isolierte Vibrionenstämme, die sich morphologisch und kulturell sehr wenig von *Vibrio fetus* unterschieden, betreffs ihrer Katalase- und Schwefelwasserstoffproduktion sowie ihrer antigenen Struktur von *Vibrio fetus* aber abwichen. Die Stämme besaßen gegenüber virginellen Färsen nicht die starke Infektiosität wie *Vibrio fetus*.

Götz (20) gibt das Wachstum der beiden Vibrionentypen in Thiol-Medium mit 0,1% Agarzusatz folgendermaßen an:

- a) Pathogene Vibrionen wachsen als schleier- oder haarknäuelartige Trübungen nur im oberen Viertel des Nährbodens, während dessen tiefere Schichten nicht getrübt werden.
- b) Apathogene Vibrionen wachsen in Form leichter, schleierartiger Trübungen sowohl dicht unter der Oberfläche als auch in den tieferen Schichten des Nährbodens bis fast zum Grunde der Röhren.

Hubrig u. Röhr (25) beschreiben die auf 20%igem Blutagar gewachsenen *Vibrio fetus*-Kolonien als kleine, rotlaufartige, im Durchmesser ca. 1-2mm große Kolonien, leicht über die Nährbodenoberfläche erhaben und teilweise unscharf begrenzt mit glatter, glänzender Oberfläche. Unter stereomikroskopischer Betrachtung besitzt die *Vibrio fetus*-Kolonie eine eigenartige, feinkörnige Granulierung, so daß sie ein bläulich-weißes Aussehen annimmt, während apathogene Vibrionenarten ein gleichartiges Wachstum von gelb-grünlicher, gelb-weißlicher bis ockerfarbiger Tönung zeigen. Auf Grund des verschiedenen Aussehens der Kolonien konnten sie in 356 von 358 Fällen bereits bei der Erstisolation sicher beurteilen, ob es sich um pathogene oder apathogene Vibrionenarten handelte.

Beide Vibrionenarten reduzieren nach Bryner u. Frank (10) Nitrate zu Nitriten.

Nach Meyn (42) ist der Nachweis einer Pathogenität oder Apathogenität von Vibrionen im Labor z. Z. nicht möglich. Er fordert deshalb außer dem Kulturversuch noch den Infektionsversuch an der virginellen Färs. Auch Wohanka u. Hubrig (82) äußern sich in ähnlichem Sinne.

III. E I G E N E U N T E R S U C H U N G E N

A. Versuchsbedingungen

1. Untersuchungsmaterial

Insgesamt wurden 500 Proben bovinen Ursprungs auf die Gegenwart von Vibrionen bakteriologisch geprüft.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit, in dem die Eignung der Cervicalschleimentnahme mittels des Brodauf'schen Sauggeräts und der von den Holländern entwickelten und von der Kopenhagener Tagung empfohlenen Vaginalpipette verglichen werden sollte, wurde der Geschlechtsapparat von 200 weiblichen Rindern auf das Vorkommen von Vibrionen untersucht.

Zu diesem Zweck wurde am Schlachthof in München der Genitaltrakt von frisch geschlachteten weiblichen Rindern ohne Auswahl bezüglich Alter und Cyklusstand der Tiere entnommen.

Es handelte sich bei den untersuchten Tieren um 8 mindestens zweijährige Kalbinnen, 189 nichttragende und 3 ca. 6 Wochen trächtige Kühe. Im zweiten Teil der Arbeit wurden 300 Proben, die an die Landesanstalt zur Feststellung von Verwerfenserregern eingesandt worden waren, kulturell auf die Anwesenheit von Vibrionen geprüft. 25 Nachgeburtproben stammten von normalen Kalbungen aus banginfizierten Beständen - es sollte nur eine Kontrolle auf das Vorhandensein von Brucellen durchgeführt werden -, 275 Proben stammten von Verwerfensfällen.

Das von Abortusfällen eingegangene Material bestand 167 mal aus den Secundinae und 57 mal aus dem Fetus. 51 mal wurden Fetus und Nachgeburt eingesandt.

Die Reinzüchtung mit anschließender biochemischer Differenzierung der herausgezüchteten Vibrionen wurde versucht.

2. Probenentnahme

a) Vom Schlachthof stammendes Material:

Um den Vergleich durchführen zu können, wurde zuerst mittels des Brodauf'schen Sauggeräts Cervicalschleim entnommen. Unter möglichst ste-

stilen Kautelen (Abflammen der Vulva, sterile Instrumente) wurde bei Kühen das Röhrenspekulum nach Prof. Dr. Abelein von 37 cm Länge und bei Kalbinnen das von 32 cm Länge in die Vagina eingeführt. Unter visueller Kontrolle wurde dann mit dem sterilen Brodauf'schen Sauggerät von der Cervix Schleim abgesaugt und sofort angezüchtet.

Nach Entfernung des Scheidenspekulums wurde eine Vaginalpipette nach holländischem Muster in die Scheide eingeführt und Schleim von der Portio vaginalis uteri abgesaugt und unmittelbar danach in den Nährboden verbracht.

Zur Kontrolle wurde dann die Fläche der Excavatio recto-uterina abgeflammt, mit sterilen Instrumenten der Vaginalraum eröffnet und mit der Öse direkt Schleim aus dem Cervixkanal entnommen und kulturell weiterverarbeitet.

b) Material von Geburten und Verwerfensfällen:

Bei vorliegender Nachgeburt wurde mittels einer Öse von ca. 3 mm Durchmesser Material von mehreren Cotyledonen abgestreift und angezüchtet. War auf diese Weise kein Untersuchungsgut zu erhalten, wurden die Cotyledonen mit einem Objektträger abgekratzt und das so gewonnene Geschabsel mit Hilfe der Öse in den Nährboden übertragen. Wurde lediglich die verworfene Frucht eingesandt, wurde bei Frühverwerfensfällen bis zum Alter von 4 Monaten Bauchhöhleninhalt mit der Öse überimpft. Bei Feten vom 5. -9. Monat wurde Mageninhalt mit der Öse in den Nährboden gebracht. In einem Fall wurde, da nur Kopf, Hals und Thorax des Fetus zur Untersuchung vorlagen, Gehirnmaterial zur Kultur verwendet. Zu diesem Zweck wurde der Kopf abgeflammt und die Schädelhöhle mit sterilen Instrumenten eröffnet.

Bei der Einsendung des Fetus mit der zugehörigen Eihaut wurden Proben von beiden nach der oben beschriebenen Art entnommen und angezüchtet.

Waren die Eihäute nicht eröffnet, was meist bei Frühverwerfensfällen vorkam, so wurde außer Bauchhöhleninhalt des Fetus und Abstrichen von den Cotyledonen auch Amnionsflüssigkeit zur Untersuchung verwendet.

In jedem Falle erfolgte die Beimpfung des Nährbodens mit möglichst viel Material.

4. Die Anzüchtung des Untersuchungsmaterials.

Um den Nachweis von Vibrionen zu führen, wurde als Nährboden ausschließlich das Difco-Thiolmedium verwendet. Ausschlaggebend für seine Verwendung waren außer den Empfehlungen in der Literatur und den guten bisher an der Anstalt gemachten Erfahrungen der niedrige Preis und die Einfachheit der Herstellung der gebrauchsfertigen Nährböden.

Geliefert als Trockensubstanz, setzt sich das Thiolmedium aus folgenden Bestandteilen zusammen:

Proteose-Pepton	10,0
Bacto-Yeast-Extract	5,0
Bacto-Dextrose	1,0
NaCl	5,0
Thiolkomplex	8,0
Bacto-Agar	1,0
p-Amino-Benzoesäure	0,25

Der pH-Wert beträgt 7,2.

30,0 der Trockensubstanz werden in 1000,0 Aq. dest. suspendiert und leicht erwärmt. Je 5 ccm der Lösung werden in Reagenzgläser abgefüllt und diese bei 121°C und 6,8 Atü 15 Minuten lang sterilisiert.

Abweichend vom Originalrezept wird auf Grund eines Hinweises des Reichseruminstitutes in Rotterdam der Agaranteil des Thiolmediums auf 0,4% erhöht, so daß ein halbfester Nährboden entsteht.

a) Schlachthofmaterial:

Zur Beimpfung wurde mit einer Öse von 3 mm Durchmesser von dem im Saugkopf des Brodauf'schen Geräts eingeschlossenen Tupfer Schleim abgenommen und entlang der Innenwand von 2 Röhrchen in den Nährboden versenkt. War nur wenig Sekret zu gewinnen, so wurde der Tupfer selbst in den Nährboden eingeführt (im folgenden als Brodauf-Methode bezeichnet).

Auf die gleiche Weise wurde von der Vaginalpipette Schleim mit der Öse abgenommen und in 2 Röhrchen übertragen (im folgenden als Pipetten-Methode bezeichnet).

Zur Kontrolle wurde mit der Öse direkt aus dem Cervicalkanal entnommener Schleim auf 2 Röhrchen überimpft (im folgenden als Cervix-Methode bezeichnet).

Es durfte erwartet werden, daß durch die Anzüchtung von 6 Röhrchen pro Geschlechtsapparat sämtliche Vibrionen-positiven Fälle erfaßt würden.

Die Anzüchtung erfolgte 2-7 Stunden nach der Schlachtung des Tieres.

b) An die Anstalt eingesandtes Material:

Die Zeit, die bis zur Anzüchtung der Proben aus Kalbungen und Abortusfällen verstrich, hing von der Dauer des Transportes zur Anstalt ab und schwankte zwischen 8 Stunden und 3 Tagen. Diese Zeit verlängert sich bei Fällen von Retentio secundinarum um die Dauer, die zwischen Kalbung bzw. Abort und Abnahme der Nachgeburt verging. Sie war aus den Begleitschreiben nicht zu entnehmen.

Die Beimpfung von 2 Röhrchen je Fall erfolgte in der unter 2 b) beschriebenen Weise.

Waren keine sonstigen Verwerfenserreger nachweisbar und bestand auf Grund der pathologisch anatomischen Veränderungen (eitrige Einschmelzung der Cotyledonen, Eihautwassersucht, oedematöse Beschaffenheit oder Mazeration und Mumifikation des Fetus) der Verdacht auf Vibrionen, so wurden ausnahmsweise vier oder sechs Röhrchen pro Probe mit Untersuchungsmaterial beschickt.

Die Röhrchen waren vor und nach der Beimpfung mit Wattepfropfen verschlossen.

Ihre Bebrütung erfolgte 3 Tage bei 37°C unter aeroben Verhältnissen.

Getrennt von dieser speziellen Prüfung auf Vibrionen im Rahmen dieser Arbeit wurden die Proben nach den üblichen Verfahren in der zuständigen Abteilung der Landesanstalt auf das Vorliegen einer infektiösen Verwerfensursache untersucht.

4. Auswertung der halbfesten Nährböden

In fast sämtlichen Röhrrchen war nach 3-tägigem Aufenthalt im Brutschrank reichliches Keimwachstum zu erkennen. Die Oberfläche war von einer gelb-weißlichen Membran bedeckt, die sich aus den verschiedensten Mikroben zusammensetzte (Kokken, Ketten, Sporenbildner mit mittel- oder endständigen Sporen, bewegliche und unbewegliche Stäbchen). Das Keimwachstum verursachte im Bereich des Impfstrichs meist scharf begrenzte, schleierartige oder wolkige Trübungen. War der Anteil der beweglichen Keime (*B. proteus* und *Pseudomonas aeruginosa*) an der saprophytären Verunreinigungsflora hoch, so war meist der ganze Nährboden getrübt. Öfters trat auch diffuse Schwarzfärbung auf.

Durch leichtes Aufschlagen des schräg gehaltenen Röhrrchens auf die Handkante wurde die oberflächliche Keimschicht abgeschleudert, so daß ohne Verunreinigung durch diese mit einer Öse ein Tropfen Material aus dem Impfstrich jeden Röhrrchens entnommen und auf einen Objektträger zur Untersuchung übertragen werden konnte. Die Probe wurde mit einem Deckgläschen bedeckt und in möglichst dünner Schicht durchmustert.

Die Prüfung der Präparate erfolgt mit dem Phasenkontrastmikroskop bei 500-facher Vergrößerung. Hier waren die Vibrionen durch ihre charakteristische ruckartige Vor- und Rückwärtsbewegung und auf Grund ihrer Morphologie (Häkchen-, Spiralen- und Kommaform) deutlich zu erkennen.

In einigen Fällen, in denen die Unterscheidung der Vibrionen von anderen Mikroben nicht sicher gelang, wurden die Präparate 3 Minuten lang mit 1:4 verdünnter Karbolfuchsinlösung gefärbt und dann beurteilt.

Befanden sich in der Kultur nur wenige Vibrionen, so wurde ein- bis zweimal auf neue Röhrrchen umgezüchtet und wieder bebrütet. Auf diese Weise gelang des öfteren eine Anreicherung der Vibrionen.

5. Die Vibrionenzüchtung auf festen Nährböden

Bei dem Versuch, Vibrionenreinkulturen zu erhalten, fanden Schokoladenblut-Agarplatten nach Voges, modifiziert nach Reymann (siehe Hallman: Bakt. Nährböden, Gg. Thieme-Verlag, Stuttgart, 1953, S. 93) mit 1% Thiolzusatz sowie Blutagarplatten, bestehend aus 2 1/2%igem Nähragar mit einem Zusatz von 10% Pferdeblut Verwendung. Der pH-Wert wurde auf 7,6 eingestellt.

Als Ausgangsmaterial zur Beimpfung der festen Nährböden dienten mikroskopisch positive Thiolkulturen. Waren in dem im Phasenkontrastmikroskop geprüften Nativpräparat viele Vibrionen festzustellen, so wurden nach Abheben des Deckglases mit dem auf dem Objektträger verbliebenen Material je nach dem prozentualen Anteil der Vibrionen am Keimgehalt und der Art der Verunreinigungsflora zwei bis vier Schokoladenblutagar- und 10%ige Pferdeblutplatten mit derselben Öse beimpft, um eine laufende Verdünnung des Materials und damit das Wachstum von Einzelkolonien zu erzielen.

Die beimpften Platten wurden anschließend in Exsiccatoren verbracht. Nach deren Abdichtung mit einem Gemisch, bestehend aus 150,0 geschmolzenem Rindertalg, 100,0 Bienenwachs und 100,0 Vaseline, wurde mit der Pfeiffer'schen Elektroluftpumpe solange evaluiert, bis das Manometer zur Ruhe gekommen war. Die Quecksilbersäule stand dann im linken Schenkel des U-Rohres etwa 1,5 cm höher als im rechten.

Zur Herstellung einer CO_2 -Atmosphäre wurde Kohlendioxyd aus der Bombe in eine Fußballblase abgefüllt und diese an das seitliche Ansatzstück des Exsiccators angeschlossen. Durch kurzes Öffnen des Hahnes konnte CO_2 in der zur Herstellung der benötigten 15-20%igen CO_2 -Atmosphäre erforderlichen Menge zum Einströmen gebracht werden.

Nach 3-tägigem Aufenthalt im Brutschrank bei 37°C wurde der Exsiccator geöffnet und die Platten mit freiem Auge oder unter Verwendung einer Lupe auf Vibrionenwachstum untersucht.

Auf den Kulturplatten war entsprechend den Verdünnungsgraden ein starkes bis geringes Wachstum vorhanden. Enthielt das Ausgangsmaterial als Verunreinigungskeime bewegliche Stäbchen in größerer Anzahl, vor allem *B. proteus*, so waren die Nährböden einschließlich der Vibrionenkolonien sehr oft von diesen Keimen überwuchert, so daß eine Isolierung unmöglich war. Die Vibrionen waren dabei häufig nur im Übersichtspräparat, das durch Vermischen eines größeren Materials von der Oberfläche in physiologischer Kochsalzlösung hergestellt wurde, nachweisbar.

Bei geringerem Bakterienwachstum wurden Teile von verdächtigen Kolonien in einem Tropfen physiologischer Kochsalzlösung auf einem Objektträger verrieben und nach Auflegen eines Deckgläschens im Phasenkontrastmikroskop geprüft. Ergab die Durchmusterung, daß es sich dabei um Vibrionen handelte,

wurde der Rest der Kolonie in Thiolmedium mit 0,1% Agarzusatz übertragen.

Differenzierung der Vibrionenstämme

Zur Feststellung der Katalaseaktivität wurde den 3 Tage bei 37°C bebrüteten Vibrionenkulturen in Thiolmedium - mit 0,1% Agaranteilen - die gleiche Menge einer 3%igen Wasserstoffperoxyd-Lösung zugesetzt und der Röhrcheninhalt durch einmaliges Umkippen durchmischt. Das Röhrchen wurde mit einem von einer Kapillarröhre durchbohrten Stopfen verschlossen und so gestellt, daß die Öffnung nach unten zeigte. Die Höhe des Inhalts wurde durch einen Farbstrich am Glas markiert. Nach 10 Minuten erfolgte die Ablesung der Reaktion. Besaßen die Vibrionen Katalaseaktivität, so wurde durch den freiwerdenden Sauerstoff die Flüssigkeit aus dem Röhrchen verdrängt, der Flüssigkeitsspiegel sank entsprechend der entwickelten Gasmenge ab.

Die katalasenegativen Vibrionen setzten keinen Sauerstoff in Freiheit, die Höhe der Flüssigkeitssäule veränderte sich nicht.

Die Prüfung auf Schwefelwasserstoffbildung erfolgte mit Hilfe des Eisensulfatagars nach Kligler, dem allerdings keine Zuckerarten zugesetzt werden (siehe Stefan-Winkle: Mikrobiologische und Serologische Diagnostik, G.Fischer-Verlag, Stuttgart, 1955, Rezept Nr. 96). Die Verwendung von Witte-Pepton ist dabei von Wichtigkeit, da von der Peptonsorte die Intensität der H_2S -Bildung abhängt.

Von der Vibrionenreinkultur werden mehrere Ösen in den Eisensulfatagar überimpft und 3 Tage bei 37°C unter normalen atmosphärischen Bedingungen bebrütet.

Eine nach ca. 36 Stunden beginnende Schwarzfärbung des ursprünglich zart-roten Nährbodens zeigt die Schwefelwasserstoffproduktion an. Wird kein H_2S erzeugt, so ändert sich die Farbe des Nährbodens nicht.

Mit fast absoluter Sicherheit konnte die Unterscheidung katalasepositiver und katalasenegativer Stämme bereits auf Grund des Oberflächen- bzw. Tiefenwachstums der Reinkulturen getroffen werden, wie bereits in der Literatur wiederholt beschrieben wurde (Akkermans, Terpstra u. van Waveren (3), Götz (20), Vandeplasseche (70)).

B. Versuchsergebnisse

1. Vom Schlachthof stammendes Material

Um ein Urteil über die Eignung der Brodauf-Methode und der Pipetten-Methode zur Cervicalschleimentnahme für den kulturellen Vibrionennachweis fällen zu können, wurden 200 Uteri von Rindern mit einem Alter von über 2 Jahren mittels der beiden Methoden untersucht. Außerdem wurde direkt aus dem Cervicalkanal entnommener Schleim als Kontrolle angezüchtet (Cervix-Methode). Mit dem Cervicalschleim, der mit einer der 3 Methoden gewonnen wurde, wurden je 2 Thiolröhrchen, also insgesamt 6 pro Uterus angezüchtet.

Von den 1200 angezüchteten Röhrchen waren bei der mikroskopischen Überprüfung in 43 Röhrchen Vibrionen nachweisbar. Diese 43 Röhrchen waren mit Cervicalschleim von 20 Uteris beimpft und zwar von 18 nicht-tragenden und einer trächtigen Kuh sowie einer Kalbin. Nachdem zur Untersuchung eines jeden Geschlechtsapparates jeweils 3 Doppelröhrchen verwendet wurden, waren also von den 20 positiven Fällen insgesamt 120 Röhrchen angezüchtet worden. Nur in 43 Röhrchen, d.s.ca. 36%, konnten Vibrionen nachgewiesen werden und zwar in 15 Röhrchen, die mit Material von der Brodauf-Methode, und jeweils 14 Röhrchen, die mit Material von der Pipetten-Methode und Cervix-Methode beimpft waren. In der Zahl der positiven Röhrchen besteht demnach kein wesentlicher Unterschied bei den 3 Verfahren, wohl aber hinsichtlich der Zahl der erfaßten positiven Fälle.

Dies ist aus der nachfolgenden Tabelle ersichtlich, in der die Ergebnisse der einzelnen Methoden bei den positiven Uteris aufgeführt sind.

Tabelle 1:

Untersuchungs- Nr.	Brodauf- Methode		Pipetten- Methode		Cervix- Methode		Ergebnis der biochemi- schen Prüfung			
	I	II	I	II	I	II				
16	+	-	-	+	+	+	Kat.	-	H ₂ S	+
27	+	+	+	+	-	-	"	-	"	+
44	+	-	-	-	-	-	"	-	"	+
58	-	-	-	-	+	-	"	-	"	+
59	-	-	+	-	-	-	"	-	"	+
71	+	-	+	-	-	-	"	-	"	+
79	+	-	-	-	-	-	"	-	"	+
80	-	-	-	-	+	+	"	+	"	-
94	-	-	-	-	-	+	"	+	"	-
102	-	-	-	-	-	+	xx)			
109	-	-	-	+	-	-	"	-	"	+
114	-	+	+	+	-	-	"	-	"	+
123	+	+	+	+	+	+	"	-	"	+
134	-	+	-	-	-	-	"	-	"	+
138	+	+	-	-	-	-	x)			
141	-	-	-	-	+	+	x)			
153	-	-	-	+	+	+	"	-	"	+
163	-	+	-	+	-	-	xx)			
176	-	-	-	+	-	-	"	-	"	+
186	+	+	+	-	+	-	"	+	"	-
<u>8 7</u>		<u>6 8</u>		<u>7 7</u>						
15		14		14						

I - Röhrchen I der jeweiligen Methode.

II - Röhrchen II der jeweiligen Methode.

x) durch Verunreinigung der Kulturen mit *B. proteus* war die Reinzüchtung der nachgewiesenen Vibrionen nicht möglich.

xx) sehr wenige Vibrionen in der Stammkultur. Trotz mehrmaligen Umzüchtens war kein stärkeres Wachstum zu erzielen.

Von den 20 positiven Fällen wurden erfaßt:

Mit der Brodauf-Methode allein	4 Fälle (44, 79, 134, 138)
Mit der Pipetten-Methode allein	3 Fälle (59, 109, 176)
Mit der Cervix-Methode allein	5 Fälle (58, 80, 94, 102, 141)
Mit der Brodauf- und Pipetten-Methode gleichzeitig	4 Fälle (27, 71, 114, 163)
Mit der Pipetten- und Cervix-Methode gleichzeitig	1 Fall (153)
Mit allen 3 Methoden gleichzeitig	3 Fälle (16, 123, 186)

Die Brodauf- und die Pipetten-Methode erbrachten demnach insgesamt jeweils in nur 11 Fällen (= 55 %) ein positives Resultat, während mit der Cervix-Methode im Geschlechtsapparat von nur 9 Tieren (= 45 %) Vibrionen nachgewiesen wurden.

Zusammenfassend ergibt sich hinsichtlich der Zahl der vibrionenhaltigen Röhrchen bei den 20 positiven Fällen, daß Vibrionen gefunden wurden:

- 9 x in 1 der 6 angezüchteten Röhrchen
- 5 x in 2 der 6 angezüchteten Röhrchen
- 2 x in 3 der 6 angezüchteten Röhrchen
- 3 x in 4 der 6 angezüchteten Röhrchen
- 1 x in allen 6 angezüchteten Röhrchen.

Die Reinzüchtung der gefundenen Vibrionen war 16 mal möglich. In 2 Fällen lag eine Verunreinigung mit *B. proteus* vor und alle Bemühungen um die Reinkultur blieben erfolglos.

Zweimal waren in der Stammkultur nur sehr wenige Vibrionen vorhanden. Trotz mehrmaligen Umzüchtens war in den Subkulturen kein stärkeres Wachstum zu erzielen, so daß die Reinzüchtung auch in diesen Fällen nicht möglich war.

Tabelle 2:

Ergebnisse der Reinzüchtung:

An der Probe- entnahme:	Zahl d. nachgew. Fälle:	davon in Reinkultur gezüchtet:	Differenzierung unmöglich:	
			Zahl:	Grund:
Brodauf- Methode insgesamt	11	9 = 81,8 %	1 1	B. proteus ungenüg. Wachstum
Pipetten- Methode insgesamt	11	9 = 81,8 %	1 1	B. proteus ungenüg. Wachstum
Cervix- Methode insgesamt	9	6 = 66,6 %	2 1	B. proteus ungenüg. Wachstum

Für die Güte der Entnahmemethode ist nicht allein maßgebend, daß mit ihr in möglichst vielen Fällen Vibrionen im Ausgangsmaterial nachgewiesen werden, sondern daß die nachgewiesenen Vibrionen auch aus den Ausgangsröhrchen reingezüchtet werden können. Vorstehende Übersicht (Tabelle 2) zeigt, daß die Brodauf- und Pipetten-Methode, die in der Praxis zur Entnahme von Cervicalschleimproben verwendbar sind, hinsichtlich Sicherheit des Nachweises und Möglichkeit der Reinzüchtung gleichwertig sind. Die Cervix-Methode ist unter praktischen Verhältnissen nicht anwendbar, sofern man nicht die Voigt'sche Tupfermethode der Cervix-Methode gleichsetzt. Letztere konnte aber im Rahmen dieser Versuche nicht geprüft werden, da das wichtigste Moment, nämlich die vermehrte Absonderung des Schleimes durch das lebende Tier nicht mehr in Betracht kam. Die Cervix-Methode wurde daher lediglich als Kontrolle durchgeführt. Sie

brachte sowohl zahlenmäßig als auch hinsichtlich der Möglichkeit der Reinkultur gegenüber den beiden anderen angewandten Methoden weniger günstige Ergebnisse. Auffallend ist aber, daß mit ihr allein 5 positive Fälle erfaßt wurden, darunter 2 von insgesamt 3 Fällen mit katalasepositiven Vibrionen. Der Nachweis katalasepositiver Vibrionen gelang demnach mit der Cervixprobe in allen Fällen (80, 94, 186), mit den beiden anderen Methoden nur in 1 Fall (186).

Die biochemische Prüfung der 16 reingezüchteten Stämme erbrachte eindeutige Ergebnisse. 3 Stämme waren katalasepositiv, bildeten keinen Schwefelwasserstoff und waren demnach als *Vibrio fetus* anzusprechen. 13 Stämme zeigten keine Katalaseaktivität, dagegen starke Schwärzung des Eisensulfatagars, so daß sie zu den apathogenen Arten gehören.

Die als pathogen zu bezeichnenden Stämme wurden aus Cervicalschleim von 2 nichtträchtigen Kühen (80, 186) und 1 Kalbin (94) isoliert. Bei letzterer dürfte es sich - nach dem Alter zu urteilen - nicht um ein jungfräuliches Tier gehandelt haben. Die im Cervicalschleim einer trächtigen Kuh (102) nachgewiesenen Vibrionen konnten wegen ungenügenden Wachstums nicht reingezüchtet und differenziert werden.

In keinem Fall gelang der Nachweis von biochemisch sich verschieden verhaltenden Vibrionenarten aus dem Cervicalschleim ein- und desselben Tieres.

In fast sämtlichen 1200 beimpften Röhrchen war starkes Wachstum von Verunreinigungskeimen der verschiedensten Art, besonders Kokken, zu erkennen. In etwa je 8% der mit Schleim der Brodauf- und Pipetten-Methode beimpften Röhrchen waren bewegliche Keime (*B. proteus*) festzustellen, desgl. in ca. 11 % der nach der Cervix-Methode angezüchteten Röhrchen.

Bei dem untersuchten Material wurde auf Grund des Eierstocksbefundes die jeweilige Zyklusphase des Tieres aufgenommen. Die Auswertung der Ergebnisse zeigte, daß die Vibrionenfunde ziemlich gleichmäßig über die ganze Zeit des Zyklus verteilt waren. Bei Tieren im oder um die Zeit des Oestrus konnten Vibrionen nicht häufiger ermittelt werden als bei im Dioestrus sich befindlichen. Von den Tieren, bei denen katalasepositive Vibrionen gefunden wurden, befand sich, nach dem Eierstocksbefund zu schließen, eines im Pro-oestrus, eines im Metroestrus und das dritte im Dioestrus.

2. An die Anstalt zur Feststellung von spezifischen Verwerfenserregern eingesandtes Untersuchungsmaterial.

Um die Frage des zahlenmäßigen Vorkommens von Vibrionen in Material von Verwerfensfällen und Nachgeburten vom Rinde zu klären, wurden 300 an die Landesanstalt für Tierseuchenbekämpfung zur Ermittlung spezifischer Verwerfenserreger eingesandte Proben kulturell auf Vibrionen untersucht.

a) Normale Nachgeburten:

Zur Untersuchung standen 25 Nachgeburten von zeitlich normalen Geburten zur Verfügung. Sie zeigten keine pathologisch-anatomischen Veränderungen. Durch die mikroskopische Untersuchung wurden in den Cotyledonen von 3 Nachgeburten Brucellen festgestellt. In denselben Secundinen wurden kulturell auch Vibrionen nachgewiesen. Der Kulturversuch mit Cotyledonenmaterial von weiteren 9 Nachgeburten erbrachte ebenfalls ein positives Ergebnis. Demnach wurden in 48% der Eihäute von Normalgeburten Vibrionen ermittelt.

b) Nachgeburten von Verwerfensfällen:

Es handelte sich dabei um 167 Fälle von Verwerfen im 5.-9. Monat der Trächtigkeit, also im Spätstadium derselben.

Durch die mikroskopische und kulturelle Untersuchung, wie sie an der Anstalt in jedem Falle durchgeführt wird, wurden in diesen Proben, abgesehen vom Kulturversuch auf Vibrionen, folgende spezifische Verwerfenserreger nachgewiesen:

- 38 x Brucellen
- 26 x Schimmelpilze
- 7 x Bact. pyogenes bovis
- 14 x Streptokokken und Staphylokokken
- 21 x E. coli

In 61 Proben konnten keine spezifischen bakteriellen Erreger nachgewiesen werden.

Der gleichzeitig mit allen Proben eingeleitete Kulturversuch auf Vibrionen erbrachte bei 167 Proben folgende Ergebnisse:

- 12 x Vibrionen in brucellenpositiven Proben
- 3 x Vibrionen neben Schimmelpilzen
- 3 x Vibrionen bei Pyogenesaborten
- 5 x Vibrionen neben Kokken, E. coli
- 22 x Vibrionen in sonst bakteriologisch negativen Proben.

Insgesamt konnten also bei 167 untersuchten Nachgeburten von Spätverwerfensfällen, in denen mikroskopisch keine Vibrionen nachweisbar waren, durch Einschaltung eines Anreicherungsverfahrens in 45 Fällen (= 26,9%) Vibrionen ermittelt werden und zwar allein oder gleichzeitig mit anderen, als spezifische Erreger des Verwerfens beim Rinde bekannten Keimen.

c) Verworfenen Früchte:

Weiterhin wurden in gleicher Weise 57 eingesandte Feten untersucht. Die allgemeine Untersuchung führte zum Nachweis nachstehender Verwerfenserreger:

- 9 x Brucellen
- 5 x Schimmelpilze
- 9 x Kokken, Colibakterien
- 1 x Pyogenes
- 33 x verlief die Untersuchung negativ.

Durch den Kulturversuch auf Vibrionen wurden diese noch

- in 1 Falle mit Brucellen,
- in 1 Falle mit Schimmelpilzen,
- in 2 Fällen mit Kokken und Colibakterien,
- in 8 Fällen bei sonst negativem Befund,

festgestellt.

Auch in abortierten Feten ohne zugehörige Nachgeburt konnten also durch das Anreicherungsverfahren des öfteren Vibrionen gleichzeitig mit oder ohne andere spezifische Verwerfenserreger nachgewiesen werden. In meinem Untersuchungsmaterial war dies in 21% möglich. Hierzu muß bemerkt werden, daß sich die Untersuchung der Feten auf Vibrionen ausschließlich auf den Magen beschränkte. Nur in einem Fall wurde das Gehirn angezüchtet,

da sämtliche Bauchorgane fehlten (Nr. 172 a 363). Die Kultur war in diesem Falle positiv, die Reinkultur und biochemische Differenzierung ergab pathogene Vibrionen.

d) Nachgeburten mit zugehörigen Feten:

Außer 167 einzelnen Nachgeburten und 57 einzelnen Feten hatte ich noch Gelegenheit, in 51 Fällen die Nachgeburt und den Fetus gleichzeitig zu untersuchen.

Vorangestellt werden auch hier die Ergebnisse der Untersuchung auf sonstige bakterielle Verwerfenserreger:

In 6 Fällen wurden Brucellen,
in 7 Fällen Schimmelpilze,
in 2 Fällen Tuberkelbakterien,
in 6 Fällen Kokkenarten, Colibakterien ect.

festgestellt.

In 30 Fällen waren keine spezifischen Verwerfenserreger zu ermitteln.

Der kulturelle Nachweis von Vibrionen gelang bei diesen 51 Proben in 27 Fällen (= 53%) und zwar

19 x ohne spezifische Verwerfenserreger
2 x gleichzeitig mit Brucellen
2 x gleichzeitig mit Schimmelpilzen
2 x gleichzeitig mit Tuberkelbakterien und
2 x gleichzeitig mit Kokken.

Von besonderem Interesse ist hier zweifellos, ob die Vibrionenfunde in den Nachgeburten und Feten übereinstimmen. Von den insgesamt 27 positiven Fällen waren

14 x Vibrionen gleichzeitig in der Nachgeburt und im Fetus
9 x Vibrionen nur im Fetus und
4 x Vibrionen nur in der Nachgeburt

nachweisbar.

e) Spät- und Frühverwerfensfälle:

Von 255 Spätverwerfensfällen (5.-9. Monat der Trächtigkeit), die

167 Nachgeburten des Abschnittes b,
54 Feten des Abschnittes c und
34 Feten und Eihäute des Abschnittes d

umfassen, wurden insgesamt in 71 Fällen (= 28%) Vibrionen festgestellt.

Außerdem stand Material von 20 Frühverwerfensfällen (1. -4. Monat) zur Untersuchung zur Verfügung. Die Einsendung bestand 3 mal allein aus dem Fetus und 17 mal aus dem Fetus mit den zugehörigen Eihäuten. In 13 Fällen, also in 65%, konnten hierbei Vibrionen ermittelt werden.

f) Mumifizierte Früchte:

Nachdem sich bereits bisher gezeigt hatte, daß speziell in total mumifizierten Feten und in Feten mit beginnender Mumifikation häufig Vibrionen nachzuweisen waren, sollen die Untersuchungsergebnisse derartiger Proben besonders angeführt werden:

Bei 19 Proben waren 13 x Vibrionen (= 68%) festzustellen. In 1 Fall lag eine Mischinfektion mit Tuberkelbakterien vor.

g) Zeit zwischen Anfall und Anzuchtung des Materials:

Von den 96 vibrionenpositiven Proben wurden 5 am Tage der Geburt bzw. des Verwerfens oder der Abnahme der Nachgeburt bei Retentio angezüchtet. Bei 28 Proben verstrich 1 Tag bis zur kulturellen Prüfung. 44 Proben wurden nach 2 Tagen untersucht. Erst nach 3 Tagen kamen 19 zur Untersuchung.

h) Reinkultur:

Der Versuch, aus den positiven Röhrchen, die mit Material aus Nachgeburten und Feten angezüchtet waren, Reinkulturen durch Überimpfung auf feste Nährmedien zu gewinnen, gelang nur in 14 von insgesamt 96 Fällen. Der Grund für dieses Ergebnis liegt nicht in einem geringen Wachstum der Vibrionen in den Ausgangsröhrchen oder in Subkulturen, sondern ausschließlich in der Überwucherung der zur Reinzüchtung verwendeten festen Nährböden mit *B. proteus*. Das häufige Vorkommen von *B. proteus* in den Ausgangsröhrchen ist nicht überraschend. Die eingesandten Proben sind meist stark mit Kot und Jauche verunreinigt, außerdem hat auf dem Transport eine

erhebliche Vermehrung der Begleitkeime stattgefunden. Das verwendete Thiolmedium hat gegenüber den gewöhnlichen Verunreinigungskeimen keine hemmende Wirkung, es stellt für diese ein gleich gutes Anreicherungs-nährmedium dar wie für Vibrionen. Das geht z.B. daraus hervor, daß auf Blut- und Drigalskiplatten, auf die Material aus fetalen Mägen im Rahmen der üblichen Untersuchung in großer Menge aufgestrichen wurde, nach 24 bis 48-stündiger Bebrütung kein Wachstum von *B. proteus* auftrat, mit dem gleichen Material beimpfte Thiolröhrchen aber durchwegs Proteuskeime enthielten. Der Versuch, das Wachstum von Proteuskeimen durch verschiedene Vorbehandlung und Zusätze zu den Nährböden zu unterdrücken, hatte keinen Erfolg.

Über die reingezüchteten Stämme gibt nachstehende Tabelle einen Überblick:

Tabelle 3:

Untersuchungs-Nr.		Untersuchungs-material:		Ergebnis:	
172a	108	Fetus	(4 Mon.)	Vibrionen + Coli	path.
172a	122	Secund.	(8 ")	Vibrionen + Kokken	"
172a	125	Fetus u. Eihaut	(4 ")	Vibrionen	""
172a	150	Secund.	(6 ")	Vibrionen	"
172a	156	Secund.	(7 ")	Vibrionen	"
172a	163	Secund.	(6 ")	Vibrionen	"
175a	73	Fetus u. Eihaut	(3 ")	Vibrionen	"
172a	253	Fetus u. Eihaut	(5 ")	Vibrionen	"
172a	264	Fetus	(5 ")	Vibrionen	"
172a	297	Fetus u. Secund.	(7 ")	Vibrionen	"
172a	310	Secund.(Normalgeb.)		Vibrionen	"
172a	312	Fetus u. Secund.	(8 ")	Vibrionen + Tuberkelbakt.	"
172a	363	Fetus	(6 ")	Vibrionen	"
172a	157	Secund.	(8 ")	Vibrionen + Schimmelpilze	"

C. Besprechung der Versuchsergebnisse

Zur Feststellung der Vibrioneninfektion beim weiblichen Rinde wird u. a. auch der kulturelle Nachweis der Erreger im Cervicalsehim angewendet. Besondere Bedeutung hat die Untersuchung des Cervicalsehmes für den indirekten Nachweis einer Infektion des Bullen. Zu diesem Zwecke wird einer jungfräulichen Kalbin während der Brunst das Zentrifugat einer Vorhautpülprobe des betreffenden Bullen intrauterin eingespritzt oder sie wird mit unverdünntem Samen des Bullen intrauterin besamt. Vom 3. Tage an sollen bei Vorliegen einer Infektion des Bullen im Cervicalsehim des infizierten weiblichen Tieres pathogene Vibrionen vorkommen. Der möglichst sichere Nachweis der pathogenen Vibrionen ist von einer sauberen Entnahme des Materials abhängig. Hierzu sind in der Literatur verschiedene Methoden angegeben worden. Zwei bekannte und in der Praxis ohne besonderen Aufwand an Zeit und Instrumenten durchführbare Methoden sollten an einer größeren Anzahl von Uteris von Schlachtrindern im Rahmen dieser Arbeit auf ihre Brauchbarkeit und Sicherheit geprüft werden. Die Anzüchtung von Schleim, der unmittelbar mit der Öse aus dem Cervicalkanal entnommen wurde, diente als Kontrolle.

Die Untersuchungen haben ergeben, daß es mit keiner der angewandten Methoden möglich ist, vorhandene Vibrionen in jedem Falle nachzuweisen. Mit der Brodauf- und der Pipetten-Methode war jeweils in 11, mit der Cervixprobe nur in 9 von insgesamt 20 positiven Fällen der Nachweis von Vibrionen möglich, wobei das Ergebnis nur in 3 Fällen mit den 3 Methoden positiv ausfiel. Aus den uneinheitlichen Ergebnissen kann jedenfalls geschlossen werden, daß die Zahl der vorhandenen Vibrionen sehr gering war. Dafür spricht weiterhin die Tatsache, daß nur 11 mal beide Röhrchen bei insgesamt 60 angezüchteten Doppelröhrchen Wachstum von Vibrionen zeigten. Die Befunde lassen ferner den Schluß zu, daß die apathogenen Vibrionen, die bei 8,5% der untersuchten Kühe festgestellt wurden, sich an der Oberfläche der Portio vaginalis uteri, weniger dagegen im Cervicalkanal, umgekehrt die pathogenen Vibrionen in erster Linie im Cervicalkanal befinden. Diese Annahme wird dadurch gestützt, daß in den mit der Brodauf- und Pipetten-Methode oberflächlich entnommenen Schleimproben häufiger apathogene Vibrionen nachzuweisen waren als bei der Cervixprobe. Es war allerdings bei Entnahme von Untersuchungsmaterial aus dem Cervical-

kanal nicht zu vermeiden, daß auch Schleim von der Oberfläche damit vermischt wurde und deshalb auch in diesen Proben wiederholt apathogene Vibrionen nachzuweisen waren. Mit der Cervix-Methode konnten dagegen in 3 Fällen pathogene Vibrionen ermittelt werden gegenüber je 1 Fall bei den beiden anderen Entnahmearten. Diese Feststellung widerspricht keineswegs den Angaben in der Literatur, daß die pathogenen Vibrionen sehr häufig an der Oberfläche des Muttermundes gefunden werden. Die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit wurden an wahllos entnommenem Material vorgenommen, während die in der Literatur angegebenen Ergebnisse vorwiegend bei künstlich infizierten Tieren und bei gezielter Probeentnahme kurze Zeit nach erfolgter Infektion erzielt wurden. Die Brodauf- und Pipetten-Methode bringen auf Grund vorliegender Ergebnisse gleich günstige Resultate hinsichtlich des zahlenmäßigen Nachweises von Vibrionen. Es hat sich ferner gezeigt, daß die Beimischung von Begleitkeimen in dem entnommenen Material ebenfalls gleich stark ist, so daß die Reinzüchtung der Vibrionen aus den Ausgangsröhrchen beider Methoden ungefähr mit gleicher Sicherheit gelingt.

Die Untersuchungen ergaben weiterhin, daß es mit der angewandten Züchtungsmethode möglich ist, Vibrionen im Cervicalschleim nachzuweisen. Da die gebrauchsfertigen Thiolröhrchen längere Zeit haltbar, leicht transportabel und versendbar sind, ferner nach der Anzüchtung nicht sofort bebrütet werden müssen und auch in angezüchtetem Zustand wiederum versendbar sind, ergibt sich die Möglichkeit, die Röhrchen auch in der Praxis zu verwenden.

Der zweite Teil der Arbeit befaßt sich mit dem Vorkommen von Vibrionen in Secundinae von normalen Geburten, in Nachgeburten von Verwerfensfällen und in verworfenen Früchten.

Durch die Einschaltung eines Anreicherungsverfahrens mit halbfesten Thiolröhrchen konnten Vibrionen in 48% der Nachgeburten von zeitlich normalen Geburten, in 26,9% der Eihäute von Spätverwerfensfällen, in 21% der verworfenen Früchte und in 53% bei gleichzeitiger Untersuchung der verworfenen Frucht mit der zugehörigen Nachgeburt, zusammen in 32% von 300 Proben ermittelt werden. Es handelte sich dabei um Fälle, die bei der mikroskopischen Untersuchung keine Vibrionen erkennen ließen. Bemerkenswert ist außerdem, daß Vibrionen häufig bei gleichzeitigem Vorliegen anderer

spezifischer Verwerfenserreger vorkommen. So wurden Vibrionen nachgewiesen:

- In 18 von 56 Proben, bei denen auch Brucellen gefunden wurden (32, 1%),
- in 6 von 38 Schimmelpilzaborten (15, 8%),
- in 14 von 60 durch andere bakterielle Erreger bedingten sporadischen Verwerfensfällen (23, 3%).

In Material von Spätverwerfensfällen waren auf Grund der aufgeführten Ergebnisse in 28%, bei Frühverwerfensfällen in 65% der Proben Vibrionen vorhanden. Besonders häufig gelang der Nachweis in total mumifizierten Früchten und in Material, das beginnende Mumifikation erkennen ließ (68%).

Die Reinzüchtung der nachgewiesenen Vibrionen gelang infolge des hohen Gehaltes an Begleitkeimen - insbesondere von *B. proteus* - nur in 14 von 96 positiven Fällen (14, 6%). Die biochemische Differenzierung dieser Stämme ergab, daß es sich bei 13 Kulturen um *Vibrio fetus* und 1 mal um apathogene Arten handelte.

Aus den vorstehenden Ergebnissen können noch keine weitergehenden Schlüsse gezogen werden, da die Reinkultur nur in einem geringen Prozentsatz gelang. Speziell über die Art der nachgewiesenen Vibrionen in den Secundinae von Normalgeburten und in Fällen mit gleichzeitigem Nachweis anderer spezifischer Verwerfenserreger sind noch keine genauen Angaben möglich, da aus diesen Proben jeweils nur in einem Falle die Reinkultur der Vibrionen gelang; es ist aber anzunehmen, daß es sich auch in diesen Fällen in einem hohen Prozentsatz um pathogene Arten gehandelt hat. Welche Bedeutung heute als pathogen angesprochene Vibrionen in diesen Fällen besitzen, kann nicht angegeben werden, da diese Frage nur auf Grund weiterer Prüfungen der Stämme, z. B. serologische Eingruppierung und Pathogenitätsprüfungen am Rinde, zu beantworten möglich scheint.

IV. Z U S A M M E N F A S S U N G

1. Cervicalschleim von 200 über 2 Jahre alten Schlachtrindern wurde mittels des Brodauf'schen Sauggeräts und der von den Holländern entwickelten Vaginalpipette entnommen, bakteriologisch auf das Vorkommen von Vibrionen untersucht und die Eignung beider Verfahren zum Vibrionennachweis verglichen. Als Nährsubstrat wurde Thiolmedium mit 0,4% Agarzusatz verwendet. Zur Kontrolle wurde ein mit einer Öse von der Schleimhaut des Cervicalkanals gewonnener Abstrich in gleicher Weise angezüchtet.

Vibrionen wurden bei 20 Tieren bei Anwendung aller 3 Methoden festgestellt. Der Nachweis gelang mit der Brodauf- und der Pipetten-Methode jeweils nur in 55% der Fälle. Beide Verfahren wurden in Bezug auf die Güte der gewonnenen Proben und die zahlenmäßige Nachweismöglichkeit von Vibrionen als gleichwertig erkannt. Bei gleichzeitiger Anwendung des Brodauf'schen Sauggeräts und der holländischen Vaginalpipette wurden 75% der insgesamt 20 positiven Fälle erfaßt. Darüber hinaus wurden im Rahmen der Kontrolluntersuchung mittels des Cervicalabstriches (Öse) weitere 5 positive Fälle festgestellt.

Die Gegenüberstellung läßt erkennen, daß zwar die gleichzeitige Anwendung der beiden geprüften Untersuchungsverfahren empfehlenswert, eine 100%ige Erfassung aller positiven Fälle aber nicht gewährleistet ist.

Die Reinkultur und biochemische Differenzierung war 16 x (= 80%) bei 20 als vibrionen-positiv erkannten Fällen möglich. 3 Stämme waren als *Vibrio fetus* anzusprechen.

2. 300 von Geburten und Abortusfällen stammende Secundinae und Feten wurden auf das Vorhandensein von Vibrionen untersucht; 58 x konnten Vibrionen allein sowie 38 x Vibrionen gleichzeitig mit anderen spezifischen Verwerfenserregern nachgewiesen werden (18 x Vibrionen und Brucellen, 6 x Vibrionen und Schimmelpilze, 6 x Vibrionen und Kokken, 3 x Vibrionen und *E. coli*, 3 x Vibrionen und *Bact. pyogenes*, 2 x Vibrionen und Tuberkelbakterien).

Die Reinzüchtung und biochemische Differenzierung der Vibrionen war wegen starker Verunreinigung mit Begleitbakterien - insbesondere *B. proteus* - nur in 14 Fällen (= 14,6%) möglich. Bei diesen handelte es sich 13 x um

katalasepositive und H_2S -negative Stämme, d.h. um *Vibrio fetus*, während sich einer der isolierten Stämme als katalasenegativ und H_2S -positiv erwies.

3. Die Vibrionen wurden mit spezifischen Abortuserregern im Material von Verwerfensfällen, aber auch in solchem von Normalgeburten ermittelt.
4. Der Nachweis katalasepositiver Vibrionen gelang noch 72 Stunden nach erfolgter Geburt bzw. nach Eintritt des Verwerfens.
5. Die Frage der Bedeutung der Vibrionen bei sporadisch auftretendem Verkalben ohne klinisch eindeutige Erscheinungen im Ursprungsbestandes sowie bei genativem bzw. zweifelhaftem Muco-Agglutinationsbefund kann noch nicht als gelöst angesehen werden. Sie bedarf einer weiteren Klärung.

- - - - -

V. L I T E R A T U R

1. Adler, H. C.: Statens Husdyrbr. Kopenhagen 1954,
zit. nach Vandeplassche u. Mitar-
beiter, Zbl. Vet. Med., 3 111 (1956).
2. Adler, H. C.: Medlemsbl. danske Dyrlaegeforen, 35
470 (1952),
zit. nach Morgan, Vet. Rec., 69, 32
(1957).
3. Akkermans, J., Terpstra,
J. I., van Waveren, H. G.: Over de betekenis van verschillende
vibrionen voor de steriliteit van
het rund,
Tschr. diergeneesk., 81 430 (1956).
4. Baier, W., Taxacher, H.: Auftreten von Vibrio fetus Infektion,
Bayer. Tierärzteblatt, 3 61 (1952).
5. Beer, J.: Vibrio fetus-Funde in Sachsen-Anhalt,
Berl. Münch. tierärztl. Wschrft., 68
10 (1955).
6. Bergey, -: Manual of determinative Bacteriolo-
gy, Vol. 5, Baltimore (148).
7. Berthelon, M., Tournaut, J.: Die Vibriosis, Rev. Méd. Vét., 105
709 (1954), 106
1/111 (1955),
ref. Vet. Med., 9 207 (1956).
8. Brodauf, H.: Über eine neue Geräteausstattung zur
Sekretentnahme aus dem Präputial-
schlauch des Bullen und von der Por-
tio vaginalis uteri des Rindes,
Mhefte Vet. Med., 9 485 (1954).
9. Brodauf, H.: Beobachtungen zum klinischen Bild
der Vibriosis,
Mhefte Vet. Med., 10 208 (1955).

10. Bryner J.H., Frank, A.H.: A Preliminary Report on the Identification of *Vibrio foetus*, Amer.J. Vet. Res., 16 176 (1955).
11. Deas, D.W.: *Vibrio fetus* beim Rind, Vet. Rec., 62 663 (1950), ref. Vet. Med., 3 503 (1950).
12. Dedič, K., Voigt, A.: Die *Vibriosis genitalis* des Rindes in Mitteldeutschland, Mhefte, Vet. Med., 10 463 (1955).
13. ---- Difco-Information 1952.
14. Doyle, -: Am. J. Vet. Res., 9 3 (1944), zit. nach Zintz, Vet. Diss. München (1955).
15. Easterbrooks, H.L.u. Mitarbeiter: *Vibriosis: Betrachtungen über Diagnostik und Therapie*, Vet. Med. L 51-56 (1955).
16. Ehrlich, J.: Beitrag zur klinischen Diagnose und Therapie der *Vibrio-Fetus-Infektion* beim Rinde, Tierärztl. Umschau, 10 421 (1955).
17. Florent, A.: Isolierung von *Vibrio-bubulus* aus Stiersamen und Vaginalschleim, Vet. Bull., 25 104 (1955), ref. Vet. Med., 8 506 (1955).
18. Frank, A.H.: Kultur-Methode für *Vibrio* Bakterien, Bericht der Tagung über die Unfruchtbarkeit des Rindes, Kopenhagen 1954.
19. Gauthier, J., Cheve, J.: Etude de l'abortement vibrionien dans l'espèce bovine. Isolement des souches de *Vibrio foetus*, Recueil méd. vét., 81 555 (1955).

20. Götz, L.: Bakteriologische Untersuchungen über das Vorkommen von Vibrionen in den Geschlechtsorganen weiblicher und männlicher Rinder,
Vet.Diss. München 1956.
21. Hansen, A., Price, K.,
Clements, J.: J.Bact., 64, 772 (1952),
zit. nach Voigt: Arch. exp. Vet. Med.,
9 124 (1955).
22. Harms, F., Hörter, R., Die Züchtung von Vibrio fetus und
Vibrio suis, Dtsch.tierärztl. Wschrft.,
60 320 (1953).
23. Hignett, P.G.: Vibrio fetus Infection in Cattle,
Vet.Rec., 63 268 (1951).
24. Hubrig, Th.: Zur bakteriologischen Diagnostik von
Vibrio fetus,
Mhefte Vet. Med., 11 271 (1956).
25. Hubrig, Th., Röhr, E.: Das charakteristische Wachstum von Vi-
brio fetus (des Rindes) auf Blutagar,
Zbl.Bakt.I, Orig., 167 233 (1956).
26. Hubrig, Th., Wohanka, K.: Serologische und biochemische Un-
tersuchungen an Vibrionen,
Berl. Münch. tierärztl. Wschrft., 69 4
(1956).
27. Hubrig, Th., Wohanka, K.,
Gränz, G.: Zur Frage der Erkennung Vibrio-fetus-
infizierter Deck- und Besamungsbullen,
Berl. Münch. tierärztl. Wschrft., 69 105
(1956).
28. Hughes, D.E.: Sammeln des Schleimes nach Tampon-
Methode,
Bericht der Tagung über die Unfruchtbar-
keit des Rindes, Kopenhagen 1954.

29. Jansen, J., Kunst, H. : Das Ei als Nährboden für *Vibrio foetus*,
Nature London, 167 564 (1951),
ref. Wien. tierärztl. Mschrft., 41 304
(1954).
30. Jones, Orcutt, Little: zit. nach Zintz,
Vet. Diss. München 1955.
31. Kawashima, H.,
Iwata, A., Suzuki, Y. : Vibriosis beim Rind. I. Vibrionen-
abort beim Rind und enzootische Steri-
lität,
Exp. Rep. Govt. exp. Sta. Anim. Hyg. Japan,
Nr. 29, 211,
ref. Vet. Bull., 26 194 (1956).
32. Koslak, A. : Ergebnisse neuerer Untersuchungen
über die Rinder-Vibriosis,
Med. wet. Warszawa, 12 148 (1956).
33. Lawson, J. R., Mc Kinnon, D. J. :
Experimental transmission of *Vibrio*
fetus,
Bericht über d. XV. Internationalen
Tierärztlichen Kongress, Stockholm
1953.
34. Lawson, J. R., Mc Kinnon, D. J. :
Kultur-Diagnose des *Vibrio foetus* bei
verdächtigen Foeten und Vagina-Schlei-
men,
Bericht der Tagung über die Unfrucht-
barkeit des Rindes, Kopenhagen 1954.
35. Leidl-, Mahrla, - : Das Verhalten von *Trichomonas foetus*
und *Vibrio foetus* bei der Tiefkühlung,
Dtsch. tierärztl. Wschrft., 61, Fortpfl.
u. Bes. d. Haustiere, 4 101 (1954).
36. Lindenstruth, R. W.,
Ward, B. Q. : Viability of *Vibrio fetus* in Hay, Soil
and Manure,
Am. Vet. Med. Ass., 113 (1948),
ref. Vet. Med., 1 273 (1948).

37. Lindquist, K. :
Das Vorkommen anderer Vibrionestämme
als *Vibrio fetus* in den Genitalorganen
des Rindes,
Nord. Vet. med., 7 826 (1955),
ref. Vet. Med., 9 208 (1956).
38. Marbach, - :
Ätiologie der Fruchtbarkeitsstörungen
beim Rind,
Mhefte Vet. Med., 10 (1955).
39. Mc Fadyean, - :
Rept. Dept. Comm. Ministry Agric. on
Epizootic Abortion, London 1909, 156,
zit. nach Rolle, M. u. Mundt, W. :
Zbl. Vet. Med., 1 759 (1954).
40. Merkt, H., Sanchez, - Garnica, C. :
Die Entnahme einer Cervixtupferprobe
zur mikrobiellen Untersuchung beim
Rinde,
Dtsch. tierärztl. Wschrft., 59, Fortpfl.
u. Bes. d. Haustiere, 2 11 (1952).
41. Messerli, W. :
Bakteriologische und serologische Unter-
suchung über den *Vibrio coli* des Schweines,
Vet. Diss. Bern 1953.
42. Meyn, A. :
Zur Frage der *Vibrio-fetus*-Infektion,
Vorlesung b. Tierärztetag 1956 in
München.
43. Morgan, B. :
A Note on the Isolation and Identifi-
cation of *Vibrio fetus* from Cattle,
The Vet. Rec., 69 32 (1957).
44. Müller, O. Fr. :
zit. nach Rolle, M. : Mikrobiologie u.
Allgemeine Seuchenlehre,
Verlag F. Enke, Stuttgart, 1949.
45. Mundt, W. :
Vibrio foetus,
Berl. Münch. tierärztl. Wschrft., 69
190 (1956).
46. Mundt, W. :
Der Nachweis von *Vibrio foetus* an ver-
schiedenen Stellen des infizierten männ-

- 4 7. N a g e l , H. C.:
lichen und weiblichen Genitalapparates
des Rindes unter besonderer Berücksich-
tigung der histopathologischen Situa-
tionendes weibl. Geschlechtstraktes,
Der prakt. Tierarzt, Nr.10 (1955).
Herd Infection with *Vibrio fetus*,
Vet.Rec., 64 264 (1952),
ref.Berl. Münch. tierärztl. Wschrft.,
66 361 (1953).
- 4 8. N o w a k , B.:
Die Züchtung von *Vibrio fetus*,
Med. wet. Warszawa, 11 12 (1955),
ref. Vet. Med., 8 358 (1955).
- 4 9. O l s o n , A.:
Spirillkastning,
Skandinavisk. Vet. Tid. -skrift för
Bakteriologi, Patologi etc. 1946.
- 5 0. P r i e r , .:
Vibrio fetus Abort,
Vet. Med. Kansas, 47 85 (1952),
ref. Vet. Med., 5 500 (1952).
- 5 1. P r ö g e r , K.:
Beitrag zur Epidemiologie der *Vibri-*
osis bei Rindern in Thüringen,
Mhefte Vet. Med., 11, 197 (1956).
- 5 2. R o b e r t s , D. S.:
Vibrionic dysentery in swine,
Austral. Vet. J., 32 27 (1956),
ref. Berl. Münch. tierärztl. Wschrft.,
69 474 (1956).
- 5 3. R o l l e , M.:
Mikrobiologie und Allgemeine Seu-
chenlehre,
Verlag F. Enke, Stuttgart, 1949.
- 5 4. R o l l e , M., M u n d t , W.: Untersuchungen über *Vibrio foetus*
und ähnliche Mikroorganismen,
Zbl. Vet. Med., 1 759 (1954).
- 5 5. S c h m i d t , G., K l i n g e r , K.: Über einige Schweinekrank-
heiten, von einem neuen aetiologi-

56. Smith, - :
schen Faktorenkomplex aus betrachtet,
Dtsch. tierärztl. Wschr., 58 285 (1951).
J. of Exp. Med., 29 701 (1918),
zit. nach Rolle, M. u. Mundt, W.: Zbl.
Vet. Med., 1 759 (1954).
57. Smith u. Mitarbeiter:
J. of Exp. Med., 30 299 (1919),
zit. nach Thomsen, A.: Dtsch. tier-
ärztl. Wschrft., 28 405 (1920).
58. Stegenga, Th.:
Vibrio foetus en Enzoötische Sterilitet,
Vet. Diss. Utrecht 1950.
59. Steger, G.:
Zur Entnahme von Sekretproben aus
dem Vaginalraum des Rindes,
Dtsch. tierärztl. Wschrft., 60 Fortpfl.
u. Bes. d. Haustiere, 3 38 (1953).
60. Stepkowski, S.:
Bemerkungen zur Diagnose der Vibrio-
sis der Rinder,
Med. wet. Warszawa, 10 129 (1955),
ref. Vet. Med., 9 63 (1956).
61. Stepkowski, S.,
Winarski, M.:
Über einen Vibrio foetus-Abort bei ei-
ner Kuh,
Med. wet. Warszawa, 10 193 (1954),
ref. Vet. Med., 8 58 (1955).
62. - - -
Bericht der Tagung über die Unfrucht-
barkeit des Rindes, Kopenhagen, 1954.
63. Terpstra, J.I.,
Eisma, W.A.:
Vibrio foetus Infection in Cattle and
Enzootic Infertility,
Tschr. diergeneesk, 433 (1951),
ref. Dtsch. tierärztl. Wschrft., 60,
Fortpfl. u. Bes. d. Haustiere, 3 7 (1953).
64. Thomsen A.:
Ein durch Spirillen bedingtes infektiöses
Verkalben. Dtsch. tierärztl. Wschrft., 28
405 (1920).

65. Thomsen, A.: Den Kongel, Veterinaer-og Landbohjskoles Aarskrift, 1923, zit. nach Witte, J.: Berl. tierärztl. Wschrft., 39 553 (1923).
66. Thouvenot, H., Florent, A.: Etudes d'un anaerobie du sperme du taureau et du vagin de la vache. Vibrio bubulus, Vet.Bull., 24 421 (1954). ref. Vet. Med., 8 58 (1955).
67. Trilenko, P.A.: Vibrionenabort beim Rinde, Weterinarija, 30 13 (1953), ref. Vet. Med., 7 368 (1954).
68. van Ulsen, -: Tschr. diergeneesk, 77 423, zit. nach Stellmacher, W.: Mhefte Vet. Med., 9 62 (1954).
69. Vallée, A.: A propos du diagnostic de la vibriose (Vibrio foetus), Recueil méd. vét., 131 91 (1955), ref. Vet. Med., 8 358 (1955).
70. Vandeplassche, M.: Gastvorlesung in Gießen, 1955.
71. Vandeplassche, M.: Vet.Bull., 25 104 (1955), zit. nach Götz, Vet. Diss. München 1956.
72. Vandeplassche, M., Paredis, F., van Niewenhuyse, E., Brone, E., Florent, A.: Beiträge zur Vibrio-foetus-Infektion bei Rindern mit besonderer Berücksichtigung der Unfruchtbarkeit, Zbl. Vet. Med., 3 111 (1956).
73. Vincent, R., Alloy, A.: Vibrionenabort beim Schaf, Bemerkungen über die Kultur von Vibrio fetus, Recueil méd. vét., 541 (1952), ref. Mhefte Vet. Med., 8 469 (1953).

74. Voigt, A.:
Über eine kulturelle Methode zur
Isolierung von *Vibrio fetus* aus geni-
talen Sekreten männlicher und weib-
licher Rinder,
Zbl.Bakt.I, Orig., 164 103 (1955).
75. Voigt, A.:
Zur Vibriosis genitalis des Rindes,
Arch.exp.Vet.Med., 9 124 (1955).
76. Weikl, A.:
Beitrag zur Vibrioneninfektion des
Rindes,
Berl.Münch.tierärztl.Wschrft., 70
136 (1957).
77. Weiß, K.:
Vibrio fetus Infektion des Rindes als
Sterilitätsursache,
Tierärztl.Umschau, 7 214 (1952).
78. Weiß, K.:
Gedanken über die Vibriosis genitalis,
Der prakt.Tierarzt, 52 Nr. 7/8/11.
79. Wilson, W.:
The occurrence of *vibrio foetus* in
aborted material derived from cows
inoculated with S. 19 Br.abortus
vaccine,
Vet.Rec., 62 589 (1950),
ref.Berl.Münchn.tierärztl.Wschrft.,
64 243 (1951).
80. Witte, J.:
Spirillen als Ursache des Abortus
beim Rinde,
Berl.tierärztl.Wschrft., 39 553 (1923).
81. Wohanka, K.:
Kritische Bemerkungen zur Frage der
Vibriosis genitalis in Rinderbesamungs-
ringen Mitteldeutschlands,
Mhefte Vet.Med., 11 101 (1956).
82. Wohanka, K., Hubrig, Th.:
Enzootische Sterilität und Vibriose.
(Beobachtungen in einer thüringi-

schen Gemeindeherde),
Berl. Münch. tierärztl. Wschrft., 69
105 (1956).

83. Z i n t z , G.:

Über das Vorkommen der Vibrionen
und Spirillen im Verdauungstraktus bei
Tieren,
Vet. Diss. München 1955.

- - - - -

Zum Abschluß der vorliegenden Arbeit gestatte ich mir, dem Direktor der Bayerischen Landesanstalt für Tierseuchenbekämpfung in Schleißheim,

Herrn Professor Dr. H. S c h e l l n e r

für die Überlassung des Themas und die großzügigen Arbeitsmöglichkeiten meinen ergebensten Dank auszusprechen.

Ferner gebührt mein besonderer Dank

Herrn Ob.Reg.Vet.Rat Dr. W e i k l

für die wertvollen, aus seiner großen Erfahrung gegebenen Ratschläge und Hinweise zur Durchführung der Versuche und für seine Unterstützung bei der Abfassung dieser Arbeit.

L e b e n s l a u f .

Ich wurde am 24. Februar 1931 als Sohn des Landwirts Friedrich Grögel und seiner Ehefrau Babette, geborene Link, in Nördlingen geboren. Im Frühjahr 1937 trat ich in die Volksschule Nördlingen ein. Im Herbst 1939 verunglückte mein Vater tödlich. Von September 1941 bis 1950 besuchte ich die Oberrealschule mit Gymnasium in Nördlingen und bestand im Juli 1950 das Abitur.

Nach einer landwirtschaftlichen Lehrzeit legte ich im Herbst 1951 die Landwirtschaftsgehilfenprüfung ab. Vom Wintersemester 1951/52 bis Sommersemester 1956 studierte ich an der tierärztlichen Fakultät der Universität München, im Dezember 1956 bestand ich die tierärztliche Prüfung. Im Anschluß daran begann ich an vorliegender Dissertation zu arbeiten.

